

**MENSCHLICHE IMMUNGLOBULINGENE VOM K - TYP :
ANALYSE DER MULTIGENFAMILIE
DURCH COSMIDKLONIERUNG , SEQUENZIERUNG UND
PULSFELD - GELELEKTROPHORESE**

BERNHARD STRAUBINGER

1987

**Menschliche Immunglobulingene vom K-Typ:
Analyse der Multigenfamilie durch Cosmidklonierung, Sequenzierung
und Pulsfeld-Gelelektrophorese**

**Dissertation
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München**

**vorgelegt von
Bernhard Straubinger
aus Schöllach**

München 1987

vorgelegt am 5. März 1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.G. Zachau
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 28. April 1987

Die vorliegende Arbeit wurde an Institut für Kristallographie
Chemie, Physikalische Bräunung und Zellulosechemie der Kaiser-
lichen Akademie in der Zeit von Mai 1905 bis Juli 1906 durch-
geführt.

für

E V I

Herrn Prof. Dr. G. Tschermak dankt der Verf. für seine Unterstützung und
Betreuung. Allen Kollegen gilt mein Dank für gute Zusammenarbeit
und Diskussionen.

Die Eigenart der Arbeit wird durch folgende Verweise festgestellt:

Strassburger, E., Fock, K., Schleich, E., Jannitsch, E., G.
Bauer, K. und Tschermak, G. (1905) Ber. Akad. Wiss. 12, 575-
577

(Tschermak, E., Strassburger, E., G., Bauer, K., Jannitsch, E., G.,
Strassburger, E. und Tschermak, G. (1906) Ber. Akad. Wiss. 13, 455-
457)

Tschermak, E., Strassburger, E., Jannitsch, E., Fock, K., Jannitsch,
E., G. und Tschermak, G. (1907) d. Mat. Wiss. 102, 245-247

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München in der Zeit von Mai 1983 bis Juli 1986 durchgeführt.

Herrn Prof. H.G. Zachau danke ich für seine Unterstützung und Betreuung. Allen Kollegen gilt mein Dank für gute Zusammenarbeit und Diskussionen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind teilweise veröffentlicht:

Straubinger, B., Pech, M., Mühlebach, K., Jaenichen, H.-R.,
Bauer, H.G. und Zachau, H.G. (1984) Nucl. Acids Res. 12, 5265-
5273

Lötscher, E., Grzeschik, K.-H., Bauer, H.G., Pohlenz, H.-D.,
Straubinger, B. und Zachau, H.G. (1986) Nature 320, 456-458

Pohlenz, H.-D., Straubinger, B., Thiebe, R., Pech, M., Zimmer,
F.-J. und Zachau, H.G. (1987) J. Mol. Biol. 193, 241-253

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung und Problemstellung.....	1
2.	Ergebnisse.....	5
2.1.	Erstellung zweier Cosmidgenbanken aus Human-DNA.....	5
2.1.1.	Konstruktionsprinzip der Genbanken.....	6
2.1.2.	Isolierung größenfraktionierter, genomischer Restriktionsfragmente.....	8
2.1.3.	Kontrollversuche zur Vermeidung von Ligierungsartefakten; DNA-Transfektion in den Wirtstamm 490 A....	10
2.1.4.	Umfang beider Genbanken und spezifische Isolierung rekombinanter Cosmidklone.....	13
2.2.	Strukturuntersuchungen verschiedener V_K -Genregionen.....	16
2.2.1.	Charakterisierung von Cosmidklonen der Region "Chr 22".....	17
2.2.2.	Charakterisierung des Cosmidklons, der die Region "Chr 5" darstellt.....	19
2.2.3.	Charakterisierung des Cosmidklons der Region "Chr 15".....	20
2.2.4.	Charakterisierung von Cosmidklonen der O-Region....	22
2.3.	Analyse der "Z-Familie", einer Gruppe translozierter V_KI -Pseudogene	25
2.3.1.	Charakterisierung der Cosmidklone der Z-Familie....	25
2.3.2.	Extendierung von Regionen der Z-Familie mit Hilfe von spezifischen Suchklonen und Untersuchungen zur chromosomalen Lokalisierung der verschiedenen Regionen (Z1 - Z4).....	29
2.3.2.1.	Extensionsversuche im 3'-Flankenbereich von Regionen der Z-Familie und Untersuchungen zur chromosomalen Lokalisierung dieser Regionen.....	31

2.3.2.1.1.	Extensionsversuche im 3'-Flankenbereich mit Hilfe des Suchklons m161-1.....	31
2.3.2.1.2.	Untersuchungen zur chromosomalen Zuordnung von Mitgliedern der Z-Familie mit Hilfe des Klons m161-1..	36
2.3.2.2.	Extendierung von Regionen der Z-Familie im 5'-Bereich und Versuche zur chromosomalen Lokalisierung dieser Regionen.....	39
2.3.2.2.1.	Extendierung der Region Z1 im 5'-Bereich mit Hilfe des Suchklons m158-1.....	39
2.3.2.2.2.	Extensionsversuche im 5'-Bereich der Region Z4 mit Hilfe des Suchklons m210-1.....	43
2.3.2.2.3.	Untersuchungen zur chromosomalen Zuordnung von Regionen der Z-Familie mit Hilfe der Suchklone m158-1 (Z1) und m210-1 (Z4).....	46
2.3.3.	Zusammenstellung der Daten, die auf eine Translokation von Regionen der Z-Familie hinweisen.....	49
2.4.	Analyse der A-Regionen (Aa, Ab), zweier genreicher, durch Duplikation auseinander hervorgegangenen, Regionen des V_K -Locus	52
2.4.1.	Charakterisierung des Kernbereiches der A-Regionen.....	52
2.4.2.	Extendierung des Kernbereiches der A-Regionen.....	57
2.4.2.1.	Extendierung im 5'-terminalen Bereich mit Hilfe von Suchklonen und einer V_K -Genprobe.....	57
2.4.2.2.	Extendierung im 3'-terminalen Bereich mit Hilfe eines spezifischen Suchklons.....	63
2.4.3.	Nachweis der Duplikation der A-Region (Aa, Ab).....	68
2.4.4.	Bestimmung der 5'-3'-Polarität der V_K -Gensegmente im Bereich der A-Regionen.....	74
2.5	Sequenzanalysen und Subgruppenbestimmung ausgewählter V_K -Gene der A-Regionen.....	81
2.5.1.	Subgruppenbestimmung durch vergleichende Hybridisierung im Falle des V_K -Genes A10.....	81
2.5.2.	Sequenzanalysen fünf ausgewählter V_K -Gene der A-Regionen.....	82

2.5.2.1.	Das V_K -Gen A3 stellt das Keimbahnäquivalent zu dem in der lymphoblastoiden Zelllinie GM 607 exprimierten V_K -Gen dar.....	86
2.5.2.2.	Durch Insertion einer Base ist das V_K -Gen A4 zu einem Pseudogen mutiert.....	89
2.5.2.3.	Die V_K -Gene A10 und A26 stellen möglicherweise Vertreter neuer, seltener V_K -Subgruppen dar.....	92
2.5.2.4.	Das Gen A20 (A6) ist durch die Insertion eines mobilen, repetitiven Elementes (in den Intronbereich) inaktiviert worden.....	98
2.5.2.5.	Nukleotidsequenz einer Subregion aus cos 142, die mit der V_{KIII} -Probe m21-4 sehr schwache Kreuzhybridisierung zeigt.....	104
2.6.	Strukturuntersuchungen und Grobkartierung der V_K -Multigenfamilie mit Hilfe der Puls-Feld-Gel-Elektrophorese (PFG).....	106
2.6.1.	Die PFG-Elektrophorese als Methode der Wahl für die Strukturanalyse von Genregionen im Bereich mehrerer Megabasen.....	106
2.6.2.	Stellt die für die Strukturanalyse eingesetzte Zelllinie ein geeignetes Untersuchungsobjekt dar und wie zuverlässig ist das gewählte DNA-Spaltsystem ?.....	107
2.6.2.1.	Liegt der V_K -Locus in der Prostata-Carzinom-Zelllinie PC3 vollständig vor ?.....	107
2.6.2.2.	Möglichkeiten und Grenzen des gewählten DNA-Spaltsystems.....	109
2.6.2.2.1.	Drei verschiedene Möglichkeiten, DNA spezifisch in sehr große Fragmente zu zerlegen.....	109
2.6.2.2.2.	Versuche zur Klärung der Frage, welchen Einfluß der Methylierungsgrad der PC-DNA auf die Spaltaktivität selten schneidender Restriktionsenzyme ausübt.....	111
2.6.2.2.3.	Versuche zur Optimierung der Spaltbedingungen.....	112
2.6.2.3.	Eingesetzte Längenstandards und Genauigkeit der Größenbestimmung von Fragmenten einer Größe von mehreren Megabasen.....	113

2.6.3.	Untersuchungen zur Strukturanalyse des V_K -Locus und Bestimmung des Maximalabstandes: V_K -Gene - C_K -Locus.....	116
2.6.3.1.	Abschätzung der Größe des V_K -Locus.....	116
2.6.3.2.	Kopplungsuntersuchungen an V_K -Genregionen.....	120
2.6.3.3.	Die Distanz zwischen dem C_K -Locus und den V_K -Genen der B-Region beträgt maximal 500 kb.....	125
2.6.4.	Ist das Leu2/T8-Gen im Bereich des bisher analysierten V_K -Locus' zu lokalisieren ?.....	127
2.6.5.	Strukturuntersuchungen an translozierten V_K -Genregionen.....	128
2.7.	Transkriptions- und Strukturuntersuchungen an den V_K I-Genen benachbarten L-Sequenzen.....	131
2.7.1.	Die L-Sequenzen werden in Prae-B-Zellen und in der nichtlymphoiden Zelllinie HeLa nicht transkribiert.....	131
2.7.2.	Die Mitglieder der L-Sequenzfamilie liegen verstreut über das gesamte Humangenom vor.....	133
3.	Diskussion.....	136
3.1.	Strategien zur Strukturanalyse der V_K -Multigenfamilie.....	136
3.2.	Welche Beiträge kann die Puls-Feld-Gel-Elektrophorese zur Strukturanalyse großer Genombereiche wie des V_K -Locus leisten ?.....	138
3.3.	Die Evolution der V_K -Genfamilie am Beispiel der A-Regionen.....	144
3.4.	Möglichkeiten der Entstehung und der Bedeutung der zahlreichen Pseudogene in der V_K -Genfamilie...	148
3.5.	Modell zur Erklärung der Translokierung einer Gruppe von V_K I-Genen (Z-Familie).....	152
3.6.	Unter welchen Gesichtspunkten könnte die Untersuchung der Sequenzbereiche zwischen den V_K -Genen interessant sein ?.....	156

4.	Materialien und Methoden.....	158
4.1.	Materialien.....	158
4.1.1.	Chemikalien und Enzyme.....	158
4.1.2.	Bakterienstämme, Vektoren und DNAs.....	159
4.1.3.	Zelllinien und Zellkultur.....	160
4.1.4.	Genbanken, Cosmide und Hybridisierungsklone.....	160
4.2.	Methoden.....	162
4.2.1.	Herstellung der Genbanken IVa und IVb.....	162
4.2.1.1.	Präparation der Vektorarme.....	162
4.2.1.2.	Präparation klonierbarer DNA-Fragmente geeigneter Größe aus menschlicher Plazenta-DNA durch Partialspaltung mit Msp I, bzw. Taq I.....	163
4.2.1.3.	Ligierung der Vektorarme mit größenfraktionierter DNA.....	164
4.2.1.4.	Herstellung der beiden komplementären Phagenextrakte und in vitro Verpackung der rekombinanten Cosmidklone.....	165
4.2.1.5.	Induktion der Phagenrezeptoren im Wirtsstamm und Transfektion.....	165
4.2.1.6.	Präparation der Koloniefilter und Anreicherung von Klonen aus Einzelkolonien.....	166
4.2.2.	Präparation von DNA.....	167
4.2.2.1.	Isolierung von Cosmid- und Plasmid-DNA.....	167
4.2.2.2.	Isolierung von DNA aus M13-Phagenklonen.....	168
4.2.2.3.	Präparation von DNA aus Kulturzellen.....	168
4.2.2.4.	Präparation hochmolekularer DNA in Agarosematrix..	169
4.2.3.	Präparation von RNA.....	169
4.2.4.	Spaltung von DNA mit Restriktionsnukleasen.....	170
4.2.4.1.	DNA-Spaltungen für Restriktionskartierungen und für präparative DNA-Isolierungen; Spaltung von Gesamt-DNA.....	170

4.2.4.2.	Spaltungen von in Agarose eingebetteter DNA.....	170
4.2.5.	Gelelektrophoresen und Isolierung von DNA-Frag- menten aus Gelen.....	171
4.2.5.1.	Konventionelle Gelelektrophoresen bei konstantem und homogenem, elektrischem Feld.....	171
4.2.5.2.	Durchführung der Puls-Feld-Gelelektrophorese ("PFG") und der Feld-Inversions-Gel-Elektropho- rese ("FIGE").....	171
4.2.5.3.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen.....	172
4.2.6.	Klonierung isolierter DNA-Fragmente in Vektoren...	173
4.2.6.1.	Klonierung von DNA-Fragmenten in M13-Phagen- vektoren.....	173
4.2.6.2.	Klonierung von DNA-Fragmenten in pBR 322.....	174
4.2.7.	DNA-Transfer auf Nitrozellulose und Hybridisie- rungen.....	175
4.2.8.	Radioaktive Markierung von DNA.....	176
4.2.9.	Sequenzierungen.....	176
4.2.10.	Zellkultur.....	177
4.2.11.	Biologische Sicherheit.....	178
4.2.12.	Computerprogramme.....	178
5.	Zusammenfassung.....	182
6.	Literaturverzeichnis.....	186
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	196

Lebenslauf

1. Einleitung und Problemstellung

Alle Wirbeltiere besitzen ein Immunsystem, welches sie befähigt, eindringende Organismen wie Bakterien, Viren, Pilze, einzellige Parasiten und deren toxische Produkte abzuwehren. Die Eliminierung von Fremdstoffen (Antigenen) erfolgt äußerst spezifisch einerseits durch die Zell-vermittelte Immunantwort, d. h. mit Hilfe von Zellen, die mit der Oberfläche des Antigens reagieren, dieses dann selbst zerstören oder andere Zellen dazu veranlassen (Ref. 1, Übersicht). Die andere Art des Schutzes besteht darin, daß Plasmazellen, die aus B-Zellen hervorgegangen sind, hochmolekulare Proteine, die Antikörper, ausschütten, welche gezielt an das jeweilige Antigen binden und dessen Vernichtung (durch Phagozytose und die enzymatischen Reaktionen des Komplementsystems) einleiten (Ref. 1, Übersicht). Entsprechend der nahezu unbegrenzten Zahl an möglichen Antigenen, muß das Immunsystem sehr viele verschiedene Antikörper bereitstellen. Man schätzt (2, 3), daß das Immunsystem der Maus oder des Menschen 10^8 oder sogar mehr unterschiedliche Antikörper produzieren kann - passend für jede mögliche (Fremd-) Struktur. Ein Antikörpermolekül setzt sich aus jeweils zwei identischen schweren (H) und zwei identischen leichten (L) Proteinketten zusammen. Die L-Ketten lassen sich ihrerseits in zwei Typen, nämlich die K- und die λ -Klasse einteilen. Durch Proteinanalysen wurde gefunden, daß die aminoterminalen Anteile dieser Ketten (V-Regionen) große Sequenzvariabilität zeigen, während die übrigen Bereiche als relativ konstant (C-Regionen) angesehen werden können (4). Innerhalb der V-Region existieren Unterabschnitte, die besonders hohe Divergenz aufweisen (hypervariable Bereiche) und letztlich die Bindungsstelle für das jeweilige Antigen darstellen.

Die Tatsache der großen Antikörpervielfalt blieb in genetisch-molekularbiologischer Hinsicht jedoch lange ein Paradoxon. Denn das Dogma, nach dem jedem Protein ein bestimmtes Gen zugeordnet wird, konnte in diesem Fall allein aufgrund der begrenzten Kodierungskapazität des Vertebratengenoms nicht zutreffen. Dreyer und Bennett postulierten daher schon in den sechziger Jahren (5), daß

verschiedene Gensegmente für die Bildung eines bestimmten Antikörperproteins zusammenwirken müßten. Allerdings konnte diese Vermutung erst mit Hilfe der Methoden der Gentechnologie bestätigt werden. Es konnte insbesondere am Beispiel des Menschen und der Maus gezeigt werden (6, 7, 8), daß im Laufe der Reifung von B-Zellen zu Plasmazellen unterschiedliche Genstücke zu einem vollständigen Antikörpergen zusammengeschaltet werden. Die Proteine der H-Kette werden von einer Genfamilie kodiert, die aus vier verschiedenen Klassen von Gensegmenten (V_H , D, J_H , C_H) besteht (Ref. 9, Übersicht). Am Aufbau der L-Ketten sind drei unterschiedliche Gensegmente beteiligt (V_L , J_L , C_L bzw. V_K , J_K , C_K ; Ref. 8). Dabei spiegeln die K- und -Genfamilien die Klassifizierung der L-Ketten in Proteine vom Typ K und λ wider. Die jeweiligen Gensegmente sind in mehreren, die V-Segmente sogar in vielen verschiedenen Kopien vorhanden (Ref. 9, Übersicht) und bilden somit ihrerseits eigene Genfamilien. Die V-Genfamilien für die H- und L-Ketten des Menschen liegen auf verschiedenen Chromosomen (Ref. 9, Übersicht), die Familie für die K-Proteine auf Chromosom 2 (10).

Die genetische Grundlage für die Antikörpervielfalt ist dadurch gewährleistet, daß die verschiedenen Gensegmente nach bestimmten Kombinationsregeln zum vollständigen Gen zusammengeschaltet werden (Ref. 9, Übersicht). Für die Bildung der leichten Kettengene erfolgt eine Umlagerung eines der zahlreichen V-Elemente an ein bestimmtes J-Segment (J_K , J_L ; Ref. 11). Im Falle der schweren Kettengene wird ein V_H -Gensegment erst nach Ankopplung an ein D-Element an ein J_H -Gensegment angefügt (12, 13). Die C_H -Gensegmente, die in relativ enger Abfolge zueinander vorliegen (Ref. 9, Übersicht), sind den J_H -Gensegmenten benachbart, und im Laufe der Reifung der B-Zellen kann das VDJ-Kopplungsprodukt an unterschiedliche C_H -Segmente sukzessive umgelagert werden, worauf die verschiedenen Immunglobulinklassen (z. B. IgM, IgG, IgE) zurückzuführen sind (14).

Die Zahl aller verschiedener Gensegmente an sich (einige hundert, Ref. 9, Übersicht) gewährleistet bereits eine beträchtliche Antikörperviariabilität. Zusätzlich zum sog. "Keimbahnrepertoire" tragen jedoch somatische Prozesse wesentlich zur Antikörpervielfalt bei.

falt bei: Abgesehen von der Möglichkeit, daß unterschiedliche Segmente verknüpft werden können (Kombinatorische Diversifizierung), gewährleistet das Phänomen, daß V-, D- und J-Elemente in unterschiedlichen Rastern verbunden werden und so an den Segment-Übergangsbereichen Variabilität schaffen, somatische Vielfalt (15, 16). Darüberhinaus sollte die somatische Hypermutation, ein mechanistisch unverstandener Prozess, zur Antikörpervariabilität wesentlich beitragen. Es handelt sich dabei um eine ungewöhnlich hohe Mutationsrate, die nur den definierten Bereich von umgelagerten V-Gensegmenten (2, 17, 18) betrifft. Schließlich wurde kürzlich gefunden, daß in der aufeinanderfolgenden Umlagerung zweier V_H -Gensegmente an ein J_H -Segment neuartige, gemischte Genprodukte entstehen können (19). Die Spekulation, daß auch über Genkonversionsereignisse somatische Antikörpervielfalt erreicht wird, ist nicht bewiesen.

Das Rätsel der Antikörperdiversität konnte also sowohl durch die Existenz verschiedener Gensegmente in der Keimbahn, als auch durch somatische Prozesse erklärt werden. Eine Abschätzung, welchen Beitrag beide Anteile zum Gesamtrepertoire an möglichen Antikörpern liefern, ist bisher nur bedingt möglich. Während der Einfluß der somatischen Vorgänge kaum quantifizierbar erscheint, sollte durch die Bestimmung der Zahl aller Mitglieder der verschiedenen Immungenfamilien die Bedeutung der Keimbahn abzuklären sein. Über Zahl und Struktur der C-, J- und D-Elemente bei Mensch und Maus herrscht weitgehend Klarheit (Ref. 9, Übersicht), jedoch sind mit Ausnahme der V_λ -Gene der Maus (20) Umfang und Struktur der V-Multigenfamilien nur unvollständig bekannt (Ref. 9, Übersicht).

Gerade hinsichtlich der Genzahl und der Organisation stellt die V_K -Genfamilie des Menschen ein sehr geeignetes Untersuchungsobjekt dar. Einerseits repräsentieren die L-Ketten vom K-Typ mit 70% der leichten Ketten im Serum des Menschen einen wesentlichen Anteil (21). Andererseits können diese V_K -Sequenzen in eine kleine Zahl von Subgruppen (V_{KI} -IV, Ref. 21, 22, 23 - möglicherweise existieren noch einige wenige seltene Subgruppen, Ref. 24) eingeteilt werden, während bei der Maus rund 30 verschiedene V_K -Sub-

gruppen vorliegen (25). Die Zahl der Maus- V_K -Gene war mit Hilfe von Blothybridisierungen auf einige hundert (26), bzw. mittels Lösungshybridisierungen (27) auf rund 2000 geschätzt worden. Im Gegensatz dazu sollte der Umfang der V_K -Genfamilie des Menschen in einem überschaubaren Größenbereich liegen. Mittels indirekter Methoden der Genzahlbestimmung (Hybridisierungsexperimente und Bandenzählung) hatten Bentley und Rabbitts die Mitgliederzahl der V_K -Familie des Menschen zunächst auf 15-20 (28, 29) und in einer späteren Arbeit (30) auf etwa 50 V-Gene bestimmt. Jedoch zeigten Untersuchungen von Klobeck (31) und V_K -Genklonierungen durch andere Mitglieder der Arbeitsgruppe (32, 33, 34), daß diese Genzahl zu gering angesetzt war.

Um die Organisation und den genauen Umfang der V_K -Multigenfamilie zu ermitteln, war in der Arbeitsgruppe von Prof. Zachau die Klonierung des gesamten V_K -Locus in Angriff genommen worden. Größere Bereiche dieser Genfamilie waren bereits mit Hilfe einer Phagengenbank (35), bzw. Cosmidgenbanken (32, 33, 34) charakterisiert worden. Um diese V_K -Regionen durch überlappende Cosmide weiter zu extendieren ("chromosomal walking"), sollten als Ausgangspunkt dieser Arbeit zunächst zwei unterschiedliche Cosmidgenbanken konstruiert werden. Diese konnten darüberhinaus dazu dienen, Cosmide mit weiteren V_K -Genen durch Einsatz von Genproben zu isolieren. Bisher nicht bekannte V-Gensegmente sollten anschließend durch Subklonierung, Hybridisierung und gegebenenfalls Sequenzierung im Detail untersucht werden. Die Bestimmung der 5'-3'-Polarität der V_K -Gene war im Hinblick auf den Umlagerungsmechanismus der V-Gene interessant. Die im Laufe der Arbeit bekannt gewordene Technik der Pulsfeld-Gelelektrophorese (36, 37, 38), welche die Auftrennung sehr großer DNA-Fragmente (mehrere Mb) erlaubt, wurde zur Grobkartierung des gesamten V_K -Locus eingesetzt.

2. Ergebnisse

2.1. Erstellung zweier Cosmidgenbanken aus Human-DNA

Die Entwicklung der rekombinanten DNA-Technologie ermöglichte es, spezifische DNA zu isolieren und im Detail zu analysieren (39, Übersicht). Eine Vielzahl von Fragen hinsichtlich der Genomorganisation läßt sich elegant lösen, wenn man möglichst große DNA-Fragmente isoliert. Gerade für die vorliegende Problemstellung, nämlich der Strukturanalyse einer Multigenfamilie, ist die Klonierung großer DNA-Fragmente besonders günstig, da in diesem Fall mehrere Gene auf demselben rekombinanten Molekül vorliegen können (33, 34, 40, 41, 42). Ein zusätzlicher Vorteil der Klonierung großer DNA-Stücke liegt darin, daß mit steigender Fragmentlänge die Zahl der zu untersuchenden rekombinanten Klone (Kolonien, Plaques) sinkt. Denn je größer die klonierten Fragmente sind, umso weniger rekombinante Moleküle sind nötig, damit ein bestimmtes Genom möglichst vollständig in einer Genbank repräsentiert ist.

Für die Klonierung in *E. coli* stehen verschiedene Vektorsysteme wie Plasmide, der Phage λ oder Cosmide zur Verfügung (43, Übersicht). Das λ -Klonierungssystem wurde häufig eingesetzt. Allerdings liegt in diesem Fall die Obergrenze der inserierbaren DNA-Stücke bei 20-25 kb. Die Größe eines Fragmentes, welches man in Plasmide einbringen kann, ist zwar theoretisch unbegrenzt, aber in der Praxis ist die Transformationsrate bei Plasmiden, welche größer als etwa 15 kb sind, sehr gering (44).

Im Gegensatz dazu erlaubt das Cosmidssystem eine effektive Klonierung von DNA-Fragmenten im Größenbereich bis zu 50 kb (45). Die Entwicklung des in vitro-Verpackungssystems beim Bakteriophagen löste das Problem der niedrigen Transformationsraten großer Plasmide weitgehend (46). Cosmide sind Plasmide, welche diejenige λ -Sequenz enthalten (cos-Stelle), welche für die Verpackung in die λ -Capside notwendig ist. Sie besitzen weiterhin ein oder mehrere Antibiotika-Resistenzgene und eine Reihe von Re-

striktionsspaltstellen für die Klonierung der zu inserierenden Fragmente und natürlich einen Replikationsursprung. Dieser stammt meist vom Plasmid Col E1.

Nach Ligierung der DNA-Fragmente mit den Vektoranteilen entstehen rekombinante Moleküle, welche das natürliche Verpackungssubstrat, die λ -Phagen-DNA, nachahmen (47). Nach Verpackung der DNA in die λ -Protein-Phagenköpfe, der Spaltung der cos-Stellen und der anschließenden Transduktion in den Wirtsstamm hat man eine günstige Größenselektion erreicht: Nur solche Rekombinanten, die mit 37-50 kb langer DNA das Capsid ausfüllen können, werden erhalten, sodaß man nur auf große Hybride zu Ungunsten kleiner, bzw. reiner Vektormoleküle selektiert hat (46, 48). Nach effektiver Transfektion in λ -sensitive Bakterien replizieren die Hybridcosmide wie Plasmide und können entsprechend der jeweiligen Antibiotika-Resistenz selektiert werden. Um die Stabilität der rekombinanten Moleküle zu gewährleisten, muß ein rec^- -Wirtsstamm eingesetzt werden. Denn von rec^+ -E.Colistämmen ist bekannt, daß Sequenzen nicht stabil vermehrt werden (49).

Gerade für die Analyse von Genfamilien (MHC , V_K), also der Untersuchung der Genomorganisation im Bereich bis zu einigen hundert kb, wurde die Cosmidtechnik mit Erfolg eingesetzt (33, 34, 40, 41, 42).

2.1.1. Konstruktionsprinzip der Cosmidgenbanken

Von Grosveld et al. (50, 51) und Ish-Horowicz et al. (52) wurde die bestehende Cosmidtechnik dahingehend verbessert, daß mögliche artifizielle Ligierungsprodukte vermieden werden können. Unter Berücksichtigung dieser Modifikation wurden zwei Cosmidgenbanken erstellt, deren Konstruktionsweise in Abb. 1 schematisch dargestellt ist.

Zunächst wurde der Vektor pHc 79, welcher Gene sowohl für die Ampicillin- als auch für die Tetracyclin-Resistenz trägt, in getrennten Ansätzen mit Pvu I, bzw. mit Sal I linearisiert. Um mögliche spätere Ligierungsartefakte (Kombination mehrerer Vektorkopien) zu vermeiden, erfolgte anschließend eine Hydrolyse der

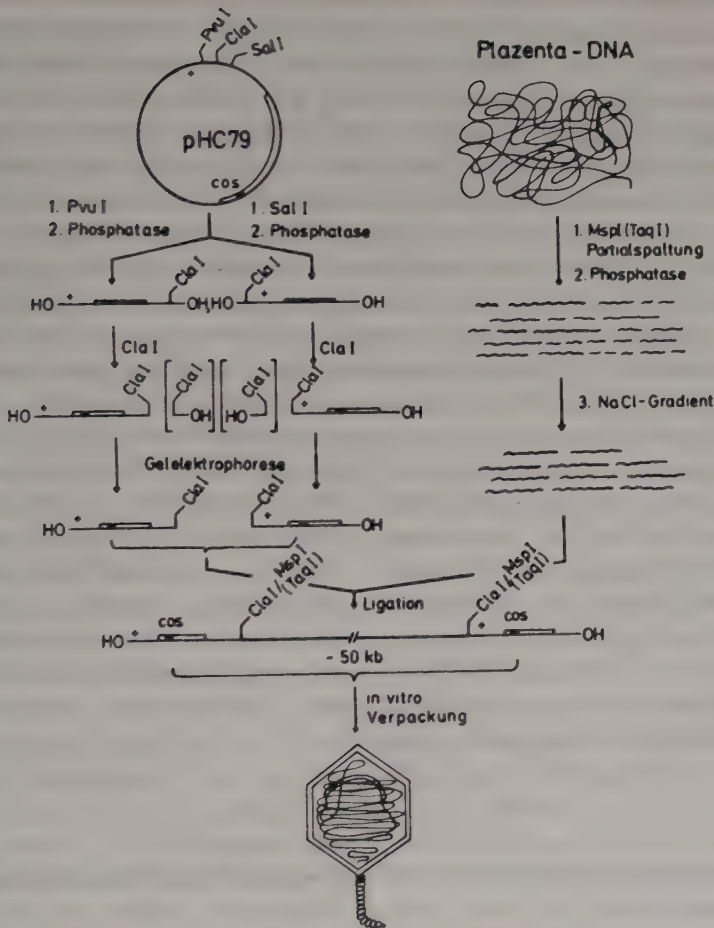


Abb. 1: Konstruktionsprinzip der beiden Cosmidgenbanken

Schematisch dargestellt ist die Klonierung von **MspI**- bzw. **TaqI**-partialgespaltener Plazenta-DNA in die **ClaI**-Stelle des Vektors **pHC 79**. Vektoranteile, die aus dem Plasmid **pBR 322** stammen, sind mit einer dünnen Linie, Bereiche aus dem Bakteriophagen λ mit offenen Balken gekennzeichnet. Die **cos**-Stelle ist durch ein Quadrat symbolisiert. Die durch Hydrolyse mit Hilfe alkalischer Phosphatase freigelegten 5'-Hydroxylenden sind mit "-OH" markiert. Auf die Position des Ampicillinresistenz-Markers ist durch ein Kreuz hingewiesen.

5'-Phosphatgruppen mit Hilfe von alkalischer Phosphatase. Im Folgeschritt wurde die Klonierungsstelle (Cla I) im Vektor durch Spaltung mit Cla I freigelegt und die dabei erzeugten, überflüssigen, kleinen Vektorfragmente, welche die cos-Sequenz nicht besitzen, gelelektrophoretisch von den gewünschten "Vektorarmen" präparativ abgetrennt. Diese Entfernung der kleinen Vektoranteile erhöht die Ausbeute an Cosmidmolekülen, bzw. Klonen wesentlich. Denn diese, durch die Cla I-Spaltung zwangsläufig erzeugten Nebenprodukte, sind aufgrund ihrer Cla I- (kompatiblen, kohäsiven) Enden mit denjenigen der gespaltenen, größenfraktionierten DNA-Moleküle ligierbar. Diese Hybride können jedoch konstruktionsbedingt keinen vollständigen Cosmidvektor bilden und vermindern die Ausbeute an rekombinanten Cosmiden.

Für die Erstellung der Genbanken IVa (MspI) und IVb (TaqI) wurde Plazenta-DNA (Individuum St) mit den Restriktionsenzymen MspI, bzw. TaqI partiell gespalten, größenfraktioniert (s.2.1.2.) und entsprechend der Strategie von Ish-Horowicz (52) in die ClaI-Stelle des Vektors pHc 79 eingebaut. Sowohl MspI (CCGG) als auch TaqI (TCGA) ergeben durch Restriktionsspaltung dieselben kohäsiven Enden (CG), welche mit den, durch ClaI (ATCGAT) im Vektor erzeugten Enden (CG), kompatibel sind. Da für MspI- und TaqI-gespaltene DNA getrennt verfahren wurde, konnten zwei verschiedene Cosmidgenbanken erstellt werden.

2.1.2. Isolierung größenfraktionierter, genomischer Restriktionsfragmente

Spaltet man hochmolekulare DNA in möglichst statistischer Weise lediglich partiell, so erhält man von ein- und derselben Region im Genom mehrere Fragmente, die sich stufenartig überdecken. Für die enzymatische Zerlegung von DNA verwendet man meist Restriktionsnukleasen mit einer tetrameren, also minimalen Erkennungssequenz. Diese spalten mit einer relativ hohen Frequenz, nämlich $1:4^4$ (unter Annahme einer statistischen Zusammensetzung der DNA).

Im vorliegenden Falle wurden MspI und TaqI eingesetzt. Deren Nachteil besteht darin, daß in ihren Erkennungssequenzen das im Eukaryontengenom statistisch unterrepräsentierte Dinucleotid CpG (53) enthalten ist. Die partielle Methylierung von Cytosin bei der DNA höherer Organismen, insbesondere wenn ein Guanosin auf ein Cytosin folgt (54), störte im Falle des bezüglich 5-Methyl-Cytosin insensitiven Enzyms MspI natürlich nicht, beim methylierungssensitiven (Methylierung von Adenin) Enzym TaqI nur wenig. (Vergleichbare Enzymaktivitäten lieferten jeweils annähernd gleich große DNA-Fragmente.)

Diese, im Vergleich zu Sau3A (GATC) etwas ungünstigeren Enzyme wurden aufgrund folgender Überlegung gewählt: Für die erste Analyse der V_K -Multigenfamilie war (nach Versuchen mit einer Phagenbank) die unter Verwendung von Sau3A hergestellte Cosmidgenbank IIIa (32, 55) eingesetzt worden. Bei der Untersuchung verschiedener Genregionen wurde dabei eine auffallend unstatistische, geringe Staffelung von zwar häufig isolierten, jedoch sehr weit überlappenden Cosmiden festgestellt (55, 56, 57). Entweder sind also die Sau3A-Erkennungssequenzen ungleichmäßiger, als man erwarten könnte, im Genom verteilt oder die Spaltbarkeit dieser Restriktionsspaltstellen variiert deutlich, wie dies von einigen Enzymen bekannt ist (58). Ausgehend von den bereits untersuchten Regionen sollten in den Genbanken die nächstfolgenden Bereiche gesucht und analysiert werden; diese Methode wird im Angelsächsischen Sprachgebrauch als "chromosomal walking" bezeichnet. Aus den oben erwähnten Gründen war es nötig, für diese Zwecke Genbanken einzusetzen, die unter Verwendung anderer Spaltenzyme als Sau3A konstruiert worden waren. Nukleasen, welche eine tetramere Erkennungssequenz besitzen, aber glatte DNA-Enden erzeugen, wurden aufgrund der bekannten ungünstigen Ligierungskinetik stumpfer DNA-Enden nicht in Betracht gezogen. Um den geringfügigen Nachteil auszugleichen, den man bei der Verwendung von Nukleasen, welche CpG in ihrer Erkennungssequenz zeigen, in Kauf nimmt, wurden zwei verschiedene Cosmidgenbanken unter Verwendung von MspI, bzw. TaqI konstruiert.

Die für die Partialspaltung einzusetzende DNA muß eine Mindestgröße von etwa 100 kb aufweisen, damit man mit guter Ausbeute DNA-Fragmente mit zwei ligierbaren Enden erhält. Die verwendbare Plazenta-DNA wies im Größenvergleich zur DNA des Bakteriophagen T5 (106 kb) auf einem 0,3 %-igen Agarosegel eine Größe von mindestens 100 kb auf, sodaß diese DNA-Präparation für die folgenden Partialspaltungen als geeignet angesehen werden konnte.

Da alle Restriktionsspaltstellen desselben Typs kinetisch nicht äquivalent sind, wurden zum Ausgleich dieser Variabilität acht deutlich verschieden lange Inkubationszeiten bei konstantem Verhältnis von Enzymmenge zu DNA für die Partialspaltungen gewählt (s. 4.2.1.2.). Die unterschiedlich stark ausgeprägten Partialspaltungen wurden vereinigt und die Restriktionsfragmente anschließend einer Behandlung mit alkalischer Phosphatase unterworfen. Die DNA-Moleküle verlieren dabei ihre einstündigen 5'-Phosphatgruppen, sodaß sie nur mehr mit den Vektorarmen, nicht jedoch mit irgendwelchen anderen DNA-Bruchstücken ligierbar sind. Artifizielle Ligierungsprodukte, wie sie ohne diesen Zwischenschritt auftreten würden (52), können dadurch ausgeschlossen werden.

Um eine Anreicherung der zu klonierenden Spaltprodukte im Größenbereich von 45 bis 50 kb zu erreichen und um die Effizienz der späteren Klonierung zu erhöhen, wurde das DNA-Fragmentgemisch über einen linearen NaCl-Gradienten (kinetische Dichtegradientenzentrifugation) größenfraktioniert (s.4.2.1.2.). Wie in Abb. 2 dargestellt, erlaubte der Gradient im entsprechenden Größenbereich eine gute Auftrennung, sodaß die DNA-Fraktion von 45-50 kb für die Cosmidklonierung ausgewählt werden konnte.

2.1.3. Kontrollversuche zur Vermeidung von Ligierungsartefakten; DNA-Transfektion in den Wirtsstamm 490 A

Bei der Konstruktion einer Cosmidgenbank kann es prinzipiell zu zweierlei Arten von Artefakten kommen:

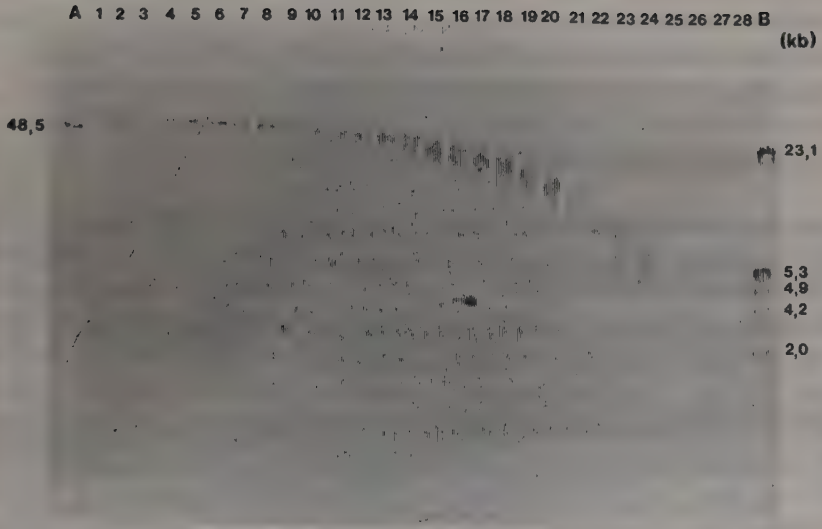


Abb. 2: Größenfraktionierung von partialgespaltener DNA (MspI) mit Hilfe eines linearen Dichtegradienten

Dargestellt ist die, auf einem 0,3%-igen Agarosegel durchgeführte, Größenbestimmung von MspI-partialgespaltener Plazenta-DNA nach Größenfraktionierung mit Hilfe linearen NaCl-Dichtegradienten. In den Bahnen 1-28 sind Aliquots aus jeder zweiten Gradientenfraktion aufgetragen. Als Längenstandard wurde die DNA des Bakteriophagen λ in ungespaltener Form (A), also in einer Größe von 48,5 kb, und in gespaltener Form (B), nämlich mit EcoRI und Hind III, eingesetzt. Die Fragmentgrößen sind am Bildrand in kb angegeben. Für die Klonierung wurde die DNA der Fraktionen 13-25 gewählt. Diese enthielten DNA-Fragmente einer Größe von 45-50 kb.

- Zum einen können (bei Unterlassung bestimmter Kontrollschritte) artifizielle Ligierungsprodukte sowohl beim Cosmidvektor als auch insbesondere bei der zu klonierenden Donor-DNA auftreten.

- Zum anderen ist bei Wirtsstämmen mit aktiver Rekombination die Möglichkeit der äußerst unerwünschten Veränderung der Cosmide gegeben.

Um letzteres auszuschließen, wurde der $recA^-$ -Phänotyp des Wirtsstammes *E. coli* 490 A qualitativ untersucht (Ref. 59, Erbslöh 1974; diesen Stamm erhielt R.E. Streeck von G. Hobom, Giessen). Als Testsystem diente die relative UV-Sensitivität. Der Vergleich von $recA^-$ -Einzelkononien mit denjenigen des Typs $recA^+$ (Kontrollstamm Le 392) zeigte, daß *E. coli* 490 A keine phänotypischen Revertanten vom Typ $recA^+$ aufwies.

Um konstruktionsbedingte Ligierungsartefakte zu minimieren, wurden folgende Kontrollversuche durchgeführt:

1. Überprüfung der Vollständigkeit der Phosphatasebehandlung von partialgespaltener Plazenta-DNA

Aliquots der partialgespaltenen DNA wurden nach erfolgter Phosphatasebehandlung einem Ligierungsversuch unterzogen. Da im Vergleich zu einer nicht mit T4-Ligase behandelten DNA-Referenz keinerlei Größenveränderung des DNA-Kontinuums zu höheren Molekulargewichten hin feststellbar war, kann man von einer vollständigen Hydrolyse der 5'-Phosphatgruppen ausgehen.

2. Kontrollversuche bezüglich der Vektorpräparation

Einerseits wurde gelelektrophoretisch die Vollständigkeit der jeweiligen Spaltungen geprüft. Anhand der entsprechenden Bandengrößen konnte das Fehlen von Ausgangsprodukten gezeigt, bzw. ein vollständiger Reaktionsablauf nachgewiesen werden.

Andererseits wurde ebenfalls die Güte der Dephosphorylierung der präparierten Vektorfragmente kontrolliert. Dazu wurden die nach Restriktionsspaltung linearisierten dephosphorylierten Vektorfragmente mit T4-Ligase behandelt. Das Ausbleiben von möglichen Vektordimeren oder Oligomeren im analytischen Agarosegel zeigte die Vollständigkeit der Phosphatasebehandlung an.

Umgekehrt sollten die endgültigen Vektorarme nach Freilegung der Klonierungsstelle (ClaI) und Entfernung des überflüssigen zweiten Spaltprodukts gut ligierbar sein. Der entsprechende Ligierungsversuch erbrachte die gewünschten Dimeren an Vektorarmen. Die Ligierbarkeit von Donor-DNA-Fragmenten in die ClaI-Stelle des Vektors war damit nachgewiesen.

Um eine möglichst hohe Ausbeute an rekombinanten Cosmidklonen zu erzielen, wurde der Stamm E. coli 490 A als Wirtsstamm gewählt. Diese hatten entsprechen den von H.-D. Pohlentz durchgeführten Testreihen (55) eine sehr gute Transfektionseffizienz gezeigt. Mit den nach F. Scalenghe et al. (60) hergestellten Extrakten für die in vitro-Verpackung rekombinanter Cosmid-DNA (Modifikation s. Ref. 51) war ein effizienter Transfer der Cosmid-DNA in die Bakterien möglich. Diese Extrakte erbrachten im Testsystem (Verpackung der Wildtyp-DNA des Bakteriophagen λ) den reproduzierbar hohen Wert von 5×10^8 pfu/ μ g λ -DNA. Ebenfalls nach Kontrollversuchen von H.-D. Pohlentz (55) wurde für die Induktion der Phagenrezeptoren im Wirtsstamm der Methode des Aushungerns der Zellen in Gegenwart von $MgSO_4$ (52) der Vorzug gegenüber dem Verfahren, die Zellen in Gegenwart von 0,2 % Maltose wachsen zu lassen (61), gegeben.

2.1.4. Umfang beider Genbanken und spezifische Isolierung rekombinanter Cosmidklone

Im Falle von Human-DNA sind bei Einsatz von Cosmidgenbanken 3×10^5 Kolonien nötig, um eine beliebige Sequenz mit mehr als 99 % Wahrscheinlichkeit aufzufinden. Dies besagt die Gleichung nach Clarke und Carbon (Ref. 62, s.u.). Man geht dabei von einem Wert von 3×10^9 bp pro haploidem menschlichem Genom aus. Für die Aufnahmekapazität des Cosmidvektor-Systems sei eine durchschnittliche Größe von 45 kb angenommen. Die erwähnte Gleichung gibt den mathematischen Zusammenhang zwischen der erforderlichen Zahl der

zu untersuchenden Klone (N), der gewünschten Auffindungswahrscheinlichkeit (P) und dem Größenverhältnis (f) von mittlerer Insertlänge zur Größe des Gesamtgenoms an:

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-f)}$$

In der Genbank IVa (Klonierung von MspI-partialgespaltener DNA), welche aus etwa $2,5 \times 10^5$ Kolonien bestand, sollte man somit jede beliebige Sequenz des Humangenoms mit 98 % Wahrscheinlichkeit finden. Für die, mit TaqI-gespaltener Plazenta-DNA konstruierte Genbank IVb ($3,5 \times 10^5$ Kolonien) liegt der entsprechende Wert bei 99 %. Da für eine Suche nach definierten Sequenzbereichen meist beide Genbanken eingesetzt wurden, war bei rund 6×10^5 Kolonien jede beliebige DNA-Sequenz mit mehr als 99,98 % Sicherheit auffindbar.

Eine Überrepräsentierung des Humangenoms mit 6×10^5 Kolonien war sehr vorteilhaft, da die Genbanken hauptsächlich zum Zwecke eines "chromosomal walkings" eingesetzt wurden. Denn, um ausgehend von definierten Bereichen angrenzende Regionen zu isolieren und analysieren zu können, ist es erwünscht, mehr als nur ein extendierendes rekombinantes Cosmid zu finden. Nur aus mehreren, sich rasterartig überdeckenden Cosmiden, läßt sich eine Extension mit maximal 40 kb in einem Schritt verwirklichen.

Die Suche nach bestimmten rekombinanten Cosmidklonen wurde folgendermaßen durchgeführt: Alle Nitrozellulose-Rundfilter der jeweiligen Genbanken wurden unter nichtstringenten Bedingungen (s.4.2.7.) mit spezifischen, radioaktiv markierten Proben hybridisiert. Die einzelnen Filter repräsentierten jeweils bis zu 10^4 Kolonien. Nach nichtstringentem Waschen (letzter Waschschrift $2 \times \text{SSC}$, 68°C) konnten die gesuchten Kolonien durch Autoradiographie nachgewiesen werden. Da jeder Koloniefilter mit Hilfe der Replica-Technik in doppelter Ausführung präpariert worden war,

konnten reelle Signale von unspezifischen Signalen unterschieden werden. Denn nur wenn auf beiden Filtern dieselbe Kolonie ein Signal zeigte, konnte man mit Sicherheit von einem positiven, hybridisierenden Klon ausgehen.

Diese Kolonien wurden von den Original-Agarplatten abgenommen. Dabei war es meist nicht zu vermeiden, daß auch eng benachbarte Klone mitgepickt wurden. Im Anreicherungsschritt, der analog der ersten Suchprozedur ablief, konnten die positiven Klone schließlich von den ebenfalls isolierten, negativen Klonen abgesondert werden. Jeweils zwei bis drei hybridisierende Klone wurden anschließend kultiviert, die Cosmid-DNA durch Schnelllysate isoliert und mit den relativ häufig spaltenden Restriktionsnukleasen BamHI, bzw. BglII gespalten. Nach Transferierung der DNA auf Nitrozellulosefilter wurden mit den entsprechenden Suchklonen Hybridisierungen durchgeführt. Sowohl die Hybridisierungsdaten, als auch die BamHI-, bzw. BglII-Fragmentmuster in den mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen ließen erste Zuordnungen von Cosmiden zu bereits etablierten V_K -Regionen zu. Zum Zwecke detaillierter Untersuchungen (Kartierung, Subklonierung, Sequenzierung) wurde die jeweilige Cosmid-DNA in größerer Menge (bis zu 1000 µg) präpariert und über CsCl-Dichtegradienten gereinigt.

2.2. Strukturuntersuchungen verschiedener V_K -Genregionen

Im Laufe der Strukturanalyse der V_K -Genfamilie fielen verschiedene Cosmide an, die bei Vorversuchen keiner der bereits etablierten Regionen zugeordnet werden konnten. Diese Klone waren bei Genbankhybridisierungen mit Proben der V_K -Subgruppe I und II isoliert worden (55, vorl. Arbeit). Ziel der Strukturuntersuchung war, zunächst durch Kartierung und Hybridisierung mit V_K -Proben die jeweiligen Regionen zu charakterisieren und aufgrund der detaillierten Analyse eventuell bereits bekannten V_K -Bereichen zuzuordnen; dies war in einigen Fällen möglich (s. 2.2.1., 2.2.4.)

Die Cosmidkartierung stellte die erste Stufe der Analyse dar und wurde in diesen und allen übrigen Fällen (2.3., 2.4.) folgendermaßen durchgeführt: Zuerst wurden Einzelspaltungen mit den Endonukleasen Cla I, Nru I, Pvu I, Sal I, Sma I und Xho I durchgeführt. Diese enthalten in ihrer Erkennungssequenz das im Eukaryotengenom unterrepräsentierte Dinukleotid CpG (54) und spalten die DNA entsprechend selten. Die häufiger spaltenden Enzyme Bgl II, Bam HI und Kpn I wurden zusätzlich verwendet; in besonderen Fällen wurden noch fünf weitere Nukleasen, Eco RI, Hind III, Hpa I, Sph I und Xba I zum Zwecke einer eindeutigen Kartierung eingesetzt. Mit denjenigen ausgewählten Enzymen, welche die Cosmid-DNA in Einzelspaltungen zerlegten, wurden Doppelspaltungen in allen Kombinationen ausgeführt. Ein diesbezügliches Beispiel ist in Abb. 3 dargestellt. Die Restriktionskarte, wurde aufgrund der erhaltenen Spaltprodukte erschlossen. In komplizierten Fällen mußte zur Vereinfachung des Kartierungsproblems der schwierig zu analysierende Teilabschnitt eines Cosmids über ein Agarosegel präparativ isoliert werden und im Detail untersucht werden.

Die auf Nitrozellulose transferierte Cosmid-DNA wurde im nächsten Schritt mit Genproben der verschiedenen Subgruppen hybridisiert, um den Ort der V_K -Gene so genau wie möglich einzugrenzen. (Im folgenden ist des öfteren lediglich von Proben der Subgruppen I - IV die Rede. Es handelt sich in diesen Fällen um diejenigen Proben, die unter 4.1.4., Tab. 10, angeführt sind.) Ein Beispiel einer Hybridisierung mit einer Probe der Subgruppe I ist in Abb.

3b dargestellt. Abgesehen von den Genloci wurden auch die Bereiche, welche repetitive Sequenzen darstellen, durch Hybridisierung mit radioaktiv markierter Human-DNA identifiziert. Sequenzen, die in mehr als einigen hundert homologen Kopien im Genom vorliegen, sind auf diese Art nachweisbar.

2.2.1. Charakterisierung von Cosmidklonen der Region "Chr 22"

Die Region "Chr 22" stellt eine Gruppe von fünf Genen dar. Diese Gene liegen, wie E. Lötscher zeigen konnte (56), nicht auf Chromosom 2, sondern auf Chromosom 22. Die Struktur dieses Bereiches wurde im Detail von H.G. Bauer (63, 64) und F.J. Zimmer (65) analysiert.

Bevor dieser Bereich etabliert worden war, waren von H.-D. Pohlenz bei der Suche mit der Genprobe der Subgruppe I (ml-3; Ref. 66) in der Genbank IIIa auch die Cosmide cos 119 und cos 120 isoliert worden (55). Bereits der Vergleich der Bam HI-, Bgl II-, Eco RI- und Hind III-Einzelspaltungen dieser beiden Klone wies auf eine hohe Homologie hin. Es konnte gezeigt werden, daß die beiden Cosmidklone weitgehend überlappen. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellten Restriktionskarten sind in Abb. 4 c dargestellt.

Durch Hybridisierung mit der Probe ml-3 (66) konnte ein V_K I-Gen auf einem 1.9 kb Bgl II-Fragment lokalisiert werden. Ein auf einem 3.0 kb Sph I-Fragment (-welches nur durch cos 120 repräsentiert wird-) liegendes V_K -Gen der Subgruppe III war aufgrund des schwachen Kreuzhybridisierungssignals mit der Probe der Subgruppe I zu erkennen. Eingehende Hybridisierungsversuche und insbesondere die Sequenzanalysen, welche von H.G. Bauer durchgeführt worden waren (63, 64) ergaben, daß im Bereich, der von cos 119 und 120 zusammen repräsentiert wird, je ein Pseudogen der Subgruppe I und III vorliegt.

Abb. 3a

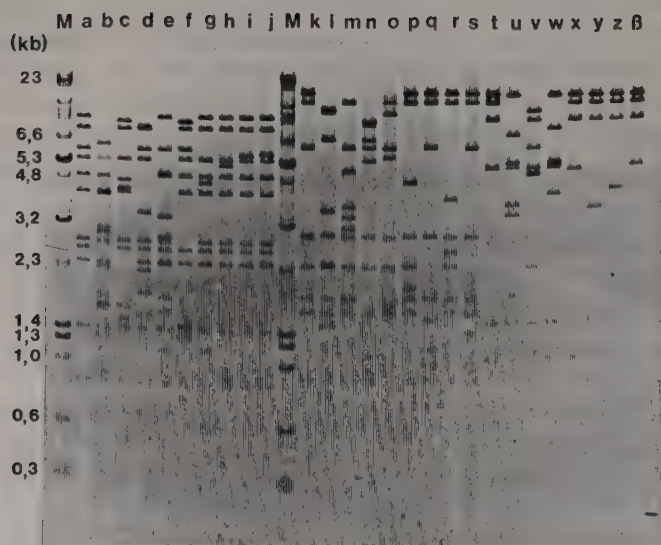


Abb. 3b

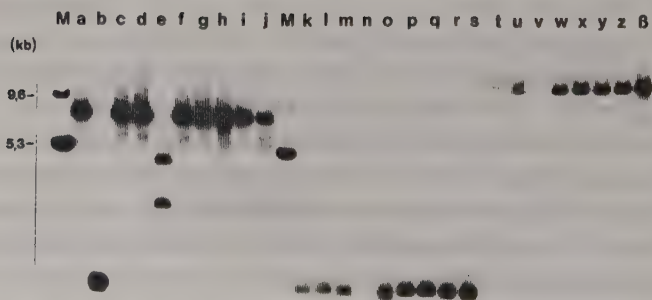


Abb. 3: Charakterisierung des Cosmids 119 durch Kartierung mit Hilfe von Doppelspaltungen (Abb. 3a) und durch Hybridisierung mit einer V_K -Probe der Subgruppe I (Abb. 3b)

In Abb. 3a ist die elektrophoretische Auftrennung von Einzel- und Doppelspaltungsprodukten von cos 119 auf einem 0,8 %-igen Agarosegel (Tris-Borat-Puffer) dargestellt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid angefärbt (1 µg/ml) und unter UV-Licht photographiert. Bei den Spuren a-z handelt es sich um folgende Restriktionsspaltungen: a, BamHI; b, BamHI + BglII; c, BamHI + SphI; d, BamHI + SmaI; e, BamHI + KpnI; f, BamHI + XhoI; g, BamHI + NruI; h, BamHI + PvuI; i, BamHI + ClaI; j, BamHI + SalI; k, BglII; l, BglII + SphI; m, BglII + SmaI; n, BglII + KpnI; o, BglII + XhoI; p, BglII + PvuI; q, BglII + NruI; r, BglII + ClaI; s, BglII + SalI; t, SphI; u, SphI + SmaI; v, SphI + KpnI; w, SphI + XhoI; x, SphI + NruI; y, SphI + PvuI; z, SphI + ClaI; β , SphI + SalI.

Für die Größenbestimmung der Fragmente wurde λ -DNA, die mit EcoRI und HindIII gespalten war, eingesetzt. Die Spuren, die Marker-DNA enthalten, sind mit "M" gekennzeichnet. Die Markerfragment-Größen sind am Bildrand in kb angegeben. Die zugehörige Restriktionskarte ist in Abb. 4 c dargestellt.

Abb. 3b: Die DNA-Fragmente von cos 119, die unter Abb. 3a beschrieben sind, waren auf Nitrozellulose transferiert und mit der V_K -Probe der Subgruppe I, ml-3 (66), hybridisiert worden. Der letzte Waschschritt erfolgte bei 2 x SSC und 68°C. Die Bezeichnung der einzelnen Spuren entspricht derjenigen aus Abb. 3a. Die Größen der Fragmente des (Hybridisierungs-)Größenmarkers, welche eine Hybridisierung mit der eingesetzten Probe ergeben, sind in kb angegeben.

2.2.2. Charakterisierung des Cosmidklons, der die Region "Chr 5" darstellt

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit der Probe m607V-3 (31) in der Genbank IIc (55) nach Cosmiden gesucht, die genomische Bereiche mit V_K -Genen der Subgruppe II tragen (2.4.2.1.). Die dabei isolierten 14 Cosmidklone konnten in Vorversuchen (Hybridisierungen) entweder bereits analysierten V_K -Regionen zugeordnet oder aufgrund ähnlicher Fragmentmuster bei Einzelspaltungen in homologe Gruppen zusammengefaßt werden (2.4. 2.1.). Für cos 219 konnte keinerlei Korrelation getroffen werden. Da es sich somit mit großer Wahrscheinlichkeit um eine bisher nicht

charakterisierte Genregion handelte, wurde in dieser Arbeit die entsprechende Restriktionskarte erstellt (Abb. 4a) und Hybridisierungen zur Lokalisierung des V_K -Gensegments durchgeführt.

Durch Hybridisierung mit der Probe m607V-3 (31) konnte ein V_K II-Gen auf einem 1.0 kb Sph I-Fragment identifiziert werden. Dagegen ergaben Hybridisierungen mit den Proben der Subgruppen I, III und IV keinerlei Signale im gesamten Bereich von cos 219. Auch Hybridisierungsversuche mit Klonen (Klonbezeichnung unter 2.4.2.1.), welche spezifisch für die bisher etablierten V_K -Regionen Aa und Ab (vorl. Arbeit), B (67), La und Lb (32, 33), 0a und 0b (34), Wa und Wb (34) sind, erlaubten keinerlei Zuordnung der durch cos 219 repräsentierten Genomregion zu bereits bekannten V_K -Bereichen. Die Vermutung lag nahe, es handle sich in diesem Falle um ein singuläres Gen, welches möglicherweise transloziert worden war.

Durch Hybridisierung von DNA aus Mensch-Nager-Hybridzelllinien mit einem für cos 219 spezifischen Subklon konnte E. Lötscher zeigen (67), daß die Region von cos 219 tatsächlich transloziert worden ist. Da die entsprechende Region dem Chromosom 5 zugeordnet werden konnte, wurde der durch cos 219 dargestellte Bereich mit "Chr 5" bezeichnet.

2.2.3. Charakterisierung des Cosmidklons der Region "Chr 15"

Mit Hilfe der Probe ml-3 (66) wurde aus der Cosmidgenbank IIIa von H.-D. Pohlenz (55) das Cosmid 118 isoliert. Dieses wurde im Rahmen dieser Arbeit näher analysiert. In der in Abb. 4 b dargestellten Restriktionskarte ist der Anteil des Cosmids, welcher mit der für Subgruppe I spezifischen Probe ml-3 (66) hybridisiert, einem 2.4 kb Bgl II-Fragment zugeordnet. Keinerlei Bereiche dieses Cosmids ergaben bei Hybridisierungen mit den Proben der Subgruppen II, III und IV Signale (1xSSC, 68°C im letzten Waschschrift).

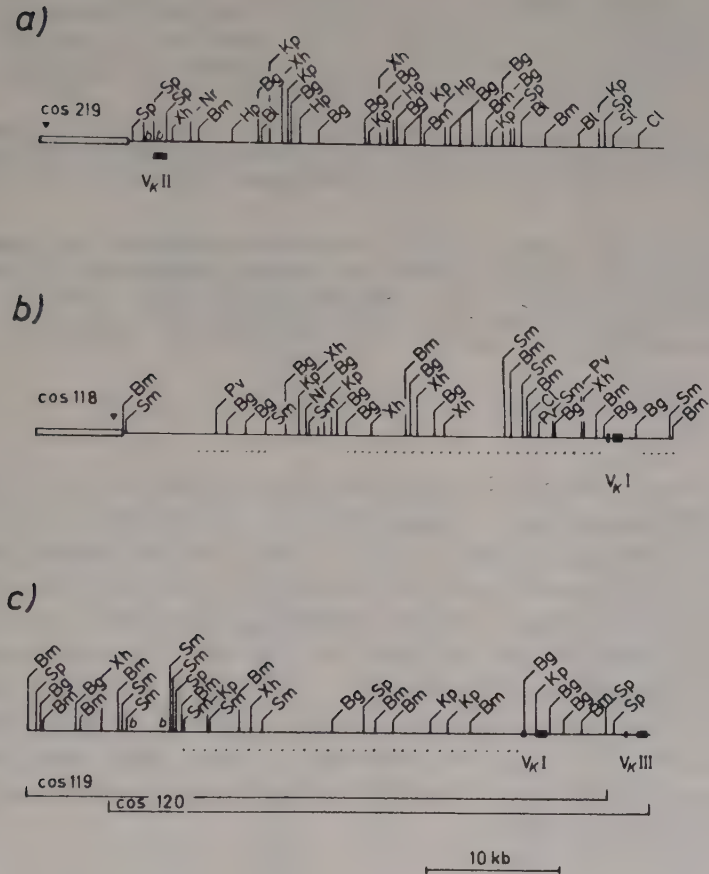


Abb. 4: Restriktionskarten von translozierten V_K -Regionen

Die V₁-Genbereiche sind durch ausgefüllte Kästchen angegeben. Regionen, die repetitive Sequenzen tragen, sind durch punktierte Linien gekennzeichnet. Die SalI-Stelle des Vektors pHC 79 ist mit einem Dreieck markiert. Mit dem Symbol "b" ist auf Restriktions-spaltstellen hingewiesen, die nicht eindeutig festzulegen waren: Nur eine der beiden angegebenen Möglichkeiten kann zutreffen. Die für die Restriktionsnukleasen verwendeten Abkürzungen sind in Kapitel 7 erläutert.

a) Restriktionskarte von cos 219. Der Bereich des Cosmids, der mit der V_K -II-Probe m607V-3 (19) hybridisiert (1 x SSC, 68°C im letzten Waschschrift), konnte auf das 1,0 kb SphI-Fragment eingegrenzt werden. Diese V_K -Region ist auf Chromosom 5 transloziert (69) und ist daher als Region "Chr 5" bezeichnet worden (69). Die Bereiche mit repetitiven Sequenzen wurden hier nicht bestimmt.

b) Dargestellt ist die Restriktionskarte von cos 118. Es handelt sich um eine V_K -Region, die nicht auf Chromosom 2 liegt (69). Cos 118 weist Ähnlichkeiten mit den V_K -Regionen der Z-Familie (2.3., Abb. 6) auf.

c) Es handelt sich hierbei um die Restriktionskarten der Cosmide 119 und 120, die einen Teilbereich der auf Chromosom 22 translozierten Region "Chr 22" (56, 64) darstellen. Die Sequenzen der beiden V_K -Gene wurden von H.G. Bauer bestimmt (56, 64). Der 5'-Signalpeptidanteil ist jeweils durch ein kleines Rechteck markiert.

Die relative Abfolge der Spaltstellen im Bereich des V_K -Gens zeigt eine Verwandtschaft dieses Gens zu einer Gruppe von nahe verwandten V_K -I-Genen (Z-Familie, 2.3.) auf. Die Mitglieder dieser Familie sind mit großer Wahrscheinlichkeit über zahlreiche Chromosomen verstreut. Somit lag die Vermutung nahe, daß es sich bei diesem Gen - ähnlich wie im Falle von cos 219 - um ein transloziertes Gensegment handeln könnte. E. Lötscher (56, 67) konnte mit einem spezifischen Suchklon zeigen, daß die entsprechende Region von cos 118 nicht auf Chromosom 2, d.h. nicht im V_K -Locus liegt. Es war jedoch nicht möglich, diesen Bereich einem spezifischen Chromosom zuzuordnen.

2.2.4. Charakterisierung von Cosmidklonen der O-Region

Von den bisher bekannten Bereichen der V_K -Multigenfamilie stellen die O-Regionen (Oa, Ob) mit 15 V_K -Genen einen wesentlichen Anteil dar (34, 67). Die O-Regionen, von welcher zwei Situationen (Oa, Ob) bekannt sind (34, 68), ist durch eine Reihe von Klonen reprä-

sentiert. Vier davon, nämlich cos 164, 203, 207 und 214, die einen Teilabschnitt der Ob-Region darstellen (34, 68), wurden im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht.

Diese Cosmide waren auf unterschiedliche Art und Weise isoliert worden: cos 164, welches als einziges dieser Gruppe zwei V_K -Gene (Subgruppe I und II) trägt, wurde bei Hybridisierung der Genbank IIIa mit der Probe ml-3 (66) von H.-D. Pohlenz gefunden (55). Durch Untersuchung der Genbank IIb mit der Probe m607V-3 (Subgruppe II; Ref. 31) wurden - ebenfalls von H.-D. Pohlenz - die Klone cos 203 und 207 isoliert. Das Cosmid 214 stammte aus der Genbank IIIc und war im Rahmen der vorliegenden Arbeit (unter Einsatz der Probe m607V-3, Ref. 31) isoliert worden (2.4.2.1.)

Die erstellten Restriktionskarten dieser Cosmide sind in Abb. 5 dargestellt und repräsentieren eine Genregion, welche zwei V_K -Gene trägt. Das V_K -Gen der Subgruppe II konnte auf einem BamHI-BglII-Fragment von 1.1 kb, dasjenige der Subgruppe I auf einem BglII-SalI-Fragment von 2.7 kb Länge lokalisiert werden. Mit Proben der Subgruppen III und IV konnten keinerlei hybridisierende Sequenzen nachgewiesen werden.

Auffallend an den vorliegenden Cosmidklonen, welche in den 5'-terminalen Bereich der Ob-Region fallen (34, 68), war, daß sich der durch cos 214 repräsentierte Bereich hinsichtlich mehrerer Spaltstellen und einer Deletion von 3.6 kb (s. Abb 5) von dem durch die übrigen Cosmide dargestellten Abschnitt unterscheidet. Ansonsten sind sowohl die Kartierungs- als auch die Hybridisierungsdaten dieser vier Cosmide völlig identisch.

Bei den beiden unterschiedlichen Bereichen könnte es sich einerseits lediglich um allelische Varianten handeln. Die andere Möglichkeit wäre, daß zwei sehr homologe, aber doch verschiedene Genloci vorliegen. Für mehrere Regionen des V_K -Locus (A-Regionen, vorl. Arbeit; L-Regionen Ref. 33; W-Regionen Ref. 34, 65) konnte Duplikationen großer Bereiche des V_K -Locus nachgewiesen werden. Auch im Falle der O-Region könnte dies zutreffen. Denn nicht nur der oben beschriebene Teilabschnitt der O-Region, sondern große Bereiche dieser Region sind in zwei unterschiedlichen, aber sehr ähnlichen Varianten, durch Cosmide repräsentiert (34, 68).

2.3. Analyse der "Z-Familie", einer Gruppe translozierter V_K I-Pseudogene

Im Laufe der Untersuchung der V_K -Genfamilie in der Arbeitsgruppe von Prof. Zachau konnte gezeigt werden, daß zwar die meisten V_K -Gene auf Chromosom 2 lokalisiert sind, eine Reihe von V_K -Genen (verschiedener Subgruppen) jedoch transloziert auf anderen Chromosomen vorliegt (56). Entsprechend den Modellen, welche die Umlagerung von V-Genen an J- bzw. D-Gensegmente zur Bildung eines Antikörpergens beschreiben (Deletions-Inversionsmodell, Ref. 70, 71, Schwesterchromatid-Austausch Ref. 72, 73) müssen die an der Umlagerung beteiligten Genloci auf demselben Chromosom vorliegen. Dies trifft für die translozierten V_K -Gene nicht mehr zu, sodaß diese Gene allein wegen ihrer Entfernung aus dem V_K -Locus als Pseudogene klassifiziert werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Hinweise gefunden, daß mehrere nahe verwandte V_K -Gene der Subgruppe I ebenfalls in translozierter Form im Genom vorkommen. Aufgrund ihres ausgeprägten Familiencharakters und ihrer genetischen "Reiselust" wurde diese kleine Sippschaft von Genen "Zigeuner-" oder "Z-Familie" getauft, wobei die verschiedenen Mitglieder oder Regionen, also die einzelnen Genloci, mit Z1 bis Z4 bezeichnet wurden.

2.3.1. Charakterisierung der Cosmidklone der Z-Familie

Bei der Untersuchung der Genbank IIIa mit dem für die Subgruppe I spezifischen Klon ml-3 (66) war von H.-D. Pohlenz eine größere Zahl von Cosmiden isoliert worden (55). Aufgrund ähnlicher Fragmentmuster von Einzelspaltungen (Bam HI, Bgl II, Eco RI, Hind III) konnten diese Cosmide zu einer homologen Gruppe - der späteren Z-Familie - zusammengefaßt werden konnten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden diese Cosmide (11 Klone) zunächst kartiert. Ein weiterer Klon, cos 110 war unabhängig davon von H. Smola (74) untersucht worden und konnte in diese Gruppe einge-

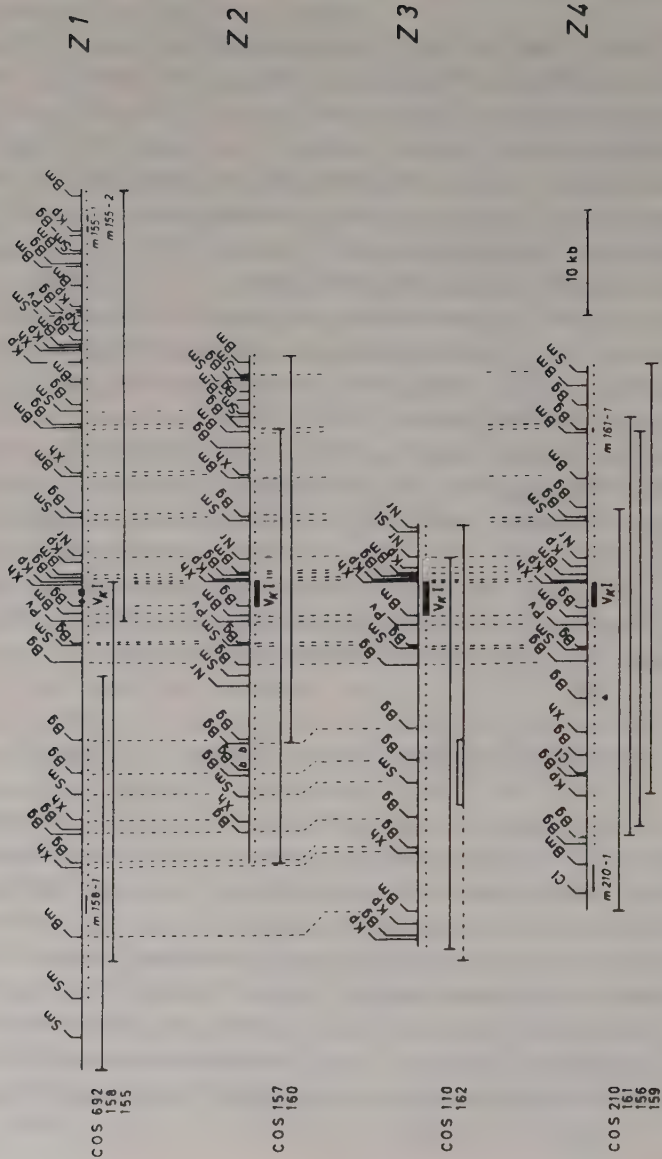


Abb. 6: Gesamtdarstellung der Z-Familie, einer Gruppe von V_K I-Genen, die mit großer Wahrscheinlichkeit transloziert im Genom vorliegt

Die vier Regionen (Z1-Z4) sind aus verschiedenen Cosmiden zusammengesetzt, deren Größe und Lage jeweils angegeben ist. Die Position der V_K I-Gene ist durch ausgefüllte Balken, die der Subklone durch dünne, waagrechte Linien gekennzeichnet. Für die Region Z1 wurde von R. Thiebe die Sequenzanalyse durchgeführt (unveröffentlicht), was die Festlegung der 5'-3'-Orientierung der Z-Regionen ermöglichte. Die waagrechten, punktierten Linien markieren die Bereiche mit repetitiven Sequenzen. (Im terminalen 5'-Bereich der Region Z1 sind die Positionen von repetitiven Sequenzen nicht bestimmt worden.) Die vertikalen, gestrichelten Linien verbinden homologe Spaltstellen und verdeutlichen die Verwandtschaft der Restriktionskarten der vier Regionen. Die ungefähre Position im 5'-Bereich von Region Z4, ab welcher ein Homologieabbruch vorliegt, ist durch ein Dreieck gekennzeichnet. Im Falle von cos 162 liegt ein Ligierungsartefakt vor: Derjenige Bereich, welcher einen Anteil der Region Z3 repräsentiert, ist mit einer durchgehenden Linie gekennzeichnet. Das artifiziell über eine Kopie des Vektors pHc 79 anligierte Fragment ist gestrichelt dargestellt.

reicht werden. Die Karten der analysierten Cosmide sind in Abb. 6 dargestellt. Sie repräsentieren vier unterschiedliche Regionen (Z1-Z4).

Durch Hybridisierung mit der Probe ml-3 (66) konnte der Bereich, welcher das V_K I-Gen trägt, eingegrenzt werden. (Hybridisierungen mit Proben der Subgruppen II, III und IV ergaben auch unter nichtstringenten Bedingungen (2 x SSC, 68°C letzter Waschschrift) keine Hinweise auf weitere V_K -Gene.) Die von einem Mitglied unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Sequenzanalyse (R. Thiebe, unveröffl.) ermöglichte es, die 5'-3'-Orientierung der Z-Regionen zu ermitteln.

Die Z-Regionen, welche innerhalb großer genomischer Bereiche (bis zu 82 kb, Z1) jeweils nur ein V_K -Gen tragen, weisen über weite Flankenabschnitte hinweg deutliche Homologie in der Abfolge der Restriktionsspaltstellen auf (Abb. 6). Man kann daher annehmen, daß Z1 bis Z4 über weite Bereiche sequenzhomolog sind. Im unmittelbaren Genbereich ist die Übereinstimmung der Spaltstel-

lenabfolge am auffälligsten. Zu den 5'- und 3'- Flankenbereichen hin nimmt diese Homologie etwas ab. Im Falle der Region Z4 findet man im 5'-Bereich einen völligen Homologieabbruch: Ab der in Abb. 6 (mit einem Dreieck) markierten Position in Z4 liegt hinsichtlich der Restriktionskarten keinerlei Ähnlichkeit mit den Regionen Z1-Z3 mehr vor und insbesondere erkennt der Extensionssuchklon m210-1 aus Z4 keine (seiner Position entsprechenden) Sequenzen aus Z1-Z3. Umgekehrt weisen die Regionen Z1 und Z3 auch in diesem 5'-Bereich eine gute Sequenzhomologie auf, da der Extensionssuchklon m 158-1 (Z1) mit dem entsprechenden Bereich der Region Z3 (cos 110) ein starkes Hybridisierungssignal (letzter Waschschr. 1 x SSC, 68°C) liefert. Für den 3'-terminalen Bereich kann man für die Regionen Z1, Z2 und Z4 mit Hilfe des Extensionssuchklons m161-1 ebenfalls eine ausgeprägte Sequenzhomologie nachweisen: Das 500 bp Bam HI-Bgl II-Fragment aus Region Z3 (cos 161) erkennt die entsprechenden BamHI-BglII-Fragmente aus Z1 und Z2 (s. Abb. 6) mit deutlicher, gleich intensiver Hybridisierungsstärke. Abbrüche in der Flankenhomologie im 3'-Bereich der Z-Regionen wurden nicht gefunden.

Ein Vergleich der Restriktionkarten der Z-Regionen mit allen anderen in der Arbeitsgruppe vorliegenden Restriktionskarten von Klonen, die V_K -Gene tragen, zeigte, daß drei weitere Regionen existieren, die Homologie zu den Z-Regionen aufweisen:

Die Regionen "Chr 1" und "Chr 15", die im wesentlichen von H.-D. Pohlentz (55) und E. Lötscher (56, 69) bearbeitet wurden, tragen ebenso wie die Z-Regionen ein singuläres V_K -Gen der Subgruppe I. Weiterhin ist die Abfolge der Restriktionsspaltstellen dieser beiden Regionen im Genbereich sehr ähnlich zu derjenigen, welche für die Z-Familie charakteristisch ist. Was allerdings die fernen Flankenbereiche von "Chr 1" und "Chr 15" betrifft, so ist kaum mehr eine Verwandtschaft zur Z-Familie zu erkennen. Für "Chr1" ist eine Translokation auf Chromosom 1 nachgewiesen (56); von "Chr 15" weiß man (56), daß diese Region nicht auf Chromosom 2 liegen kann, wobei eine genaue Lokalisierung bisher jedoch noch nicht möglich war (69).

Eine weitere Region "Chr 22", welche eine auf Chromosom 22 translozierte Gruppe von fünf V_K -Genen darstellt (55, 56, 63, 65), weist für den Bereich eines dieser Gene, ein V_{KI} -Gen, die gleichen Charakteristika auf, wie die V_K -Gene der Z-Regionen: gleicher Subgruppentypus und insbesondere große Ähnlichkeit der Spaltstellenabfolge im Genbereich.

2.3.2. Extendierung von Regionen der Z-Familie mit Hilfe spezifischer Suchklone und Untersuchungen zur chromosomalen Lokalisierung der verschiedenen Regionen (Z1-Z4)

Um die Frage zu klären, ob in größerer Entfernung vom singulären V_{KI} -Gen der Z-Regionen weitere V_K -Gene vorliegen, wurde versucht, die Regionen Z1-Z4 mittels der Technik des "chromosomal walkings" zu extendieren. Außerdem sollte auf diese Weise untersucht werden, ob die Homologie der Z-Regionen über die bisher bekannten Bereiche hinausgeht oder ob Abbrüche in der Homologie festzustellen sind.

Die nähere Vorgehensweise war folgende: Zunächst wurde dasjenige Cosmid, welches den terminalen Anteil der zu extendierenden Region darstellte, im Randbereich möglichst genau kartiert. Zu diesem Zweck wurden entweder DNA-Fragmente aus dem entsprechenden Abschnitt dieser Regionen isoliert oder auch subkloniert, um genügend Material für die anschließende Feinkartierung zur Verfügung zu haben. In Ausnahmefällen war bereits die übliche Kartierung der Cosmide ausreichend, sodaß ohne den Zwischenschritt der Feinkartierung sofort ein (potentieller) Suchklon konstruiert werden konnte (ml61-1: 2.3.2.1.1.). Ein Extensionssuchklon wurde nach folgenden Kriterien hergestellt und auf seine Eignung für ein "chromosomal walking" untersucht:

1. Die DNA aus dem terminalen Bereich der jeweiligen Region wurde mit Restriktionnukleasen gespalten, die erhaltenen Fragmente auf Nitrozellulose transferiert und mit radioaktiv markierter Gesamt-DNA (Plazenta-DNA) hybridisiert. Dadurch sind

DNA-Bereiche, die mittel- und hochrepetitive Sequenzen ($n \times 10^2$ bis $n \times 10^5$ Kopien pro Genom) tragen, aufgrund ihrer Hybridisierung zu erkennen. Nur DNA-Fragmente, die auch unter nichtstringenten Bedingungen ($2 \times \text{SSC}$, 68°C im letzten Waschschrift) und längerer Autoradiographie kein Signal zeigten, kamen für Extensionsversuche in Frage und wurden in den Phagenvektor M 13 kloniert.

2. Da niedrigrepetitive Sequenzen (maximal $n \times 10^2$ Kopien pro Genom) anhand des ersten Kriteriums nicht zu identifizieren sind, jedoch als Suchklone natürlich nicht in Frage kommen, wurde anschließend geprüft, in wievielen Kopien die klonierten Fragmente im Genom vorliegen. Zu diesem Zweck wurde Plazenta-DNA mit relativ häufig spaltenden Restriktionsnukleasen (BamHI, BglII, HindIII, EcoRI) gespalten, nach elektrophoretischer Auftrennung auf Nitrozellulose transferiert und mit den jeweiligen radioaktiv markierten, potentiellen Suchklonen hybridisiert. Im günstigsten Falle erkannte der jeweilige, überprüfte Suchklon pro DNA-Spaltung nur eine einzige hybridisierende Bande ($1 \times \text{SSC}$, 68°C im letzten Waschschrift) - nämlich seine zugehörige Ursprungsregion.

3. Falls ein Suchklon nur eine hybridisierende Bande in gespaltenen, genomischer DNA aufweist, so können dennoch mehrere Kopien einer sehr homologen Sequenz, welche Restriktionsfragmente gleicher Länge ergeben würden, darin verborgen sein. Gerade im Falle von Multigenfamilien, wo verschiedene V_K -Gene über weite Flankenbereiche hinweg Homologien aufweisen, kann dies der Fall sein. Da bereits ein beträchtlicher Teil der V_K -Genfamilie kloniert war (33, 34, 56, vorl. Arbeit), konnte ein Kontrollversuch zur Untersuchung dieser Frage durchgeführt werden. Cosmide, welche alle bis zu diesem Zeitpunkt analysierten Regionen repräsentierten, wurden nach Restriktionsspaltung und elektrophoretischer Auftrennung auf Nitrozellulose transferiert und mit den jeweiligen radioaktiv markierten Suchklonen hybridisiert. Sequenzen, die wirklich nur in einer einzigen Kopie im Genom vorliegen, sollten nur ein Cosmid erkennen, während homologe Kopien durch mehrere hybridisierende Cosmide identifiziert werden können.

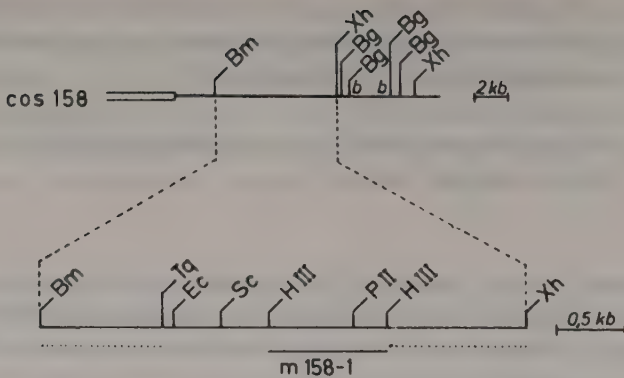
2.3.2.1. Extensionsversuche im 3'-Flankenbereich von Regionen der Z-Familie und Untersuchungen zur chromosomalen Lokalisierung dieser Regionen

2.3.2.1.1. Extensionsversuche im 3'-Flankenbereich mit Hilfe des Suchklons ml61-1

Um die Region Z1 (s. Abb. 6) im 3'-terminalen Bereich zu extendieren, wurde zunächst ein 5,8 kb ClaI-SmaI-Fragment präparativ isoliert und feinkartiert (Abb. 7b). Nachdem durch Hybridisierung mit radioaktiv markierter Plazenta-DNA Bereiche mit mittel- und hochrepetitiven Sequenzen lokalisiert worden waren (s. Abb. 7b), wurden sowohl ein 1,0 kb EcoRI-SacI-Fragment (ml55-1) als auch ein 0,5 kb SacI-Fragment (ml55-2), welche kein Signal ergeben hatten, jeweils in den Vektor M13 mp 10 kloniert. (Angaben zur Konstruktion von Klonen aus den Z-Regionen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.) Da jedoch die Hybridisierung beider möglicher Extensionssuchklone mit gespaltenen Plazenta-DNA (BamHI, BglII, EcoRI, SacI) jeweils eine Kopienzahl der klonierten Sequenzen von etwa 20 anzeigte, konnten diese niedrigrepetitiven Sequenzen für einen Extensionsversuch nicht eingesetzt werden.

Um dennoch im 3'-terminalen Bereich der Z-Regionen eine Extension vornehmen zu können, wurde nach den unter 2.3.2. erläuterten Kriterien der Suchklon ml61-1 hergestellt. Ein 500 bp BamHI-BglII-Fragment aus der Region Z4 (cos 161) wurde in den Vektor M13 mp 10 kloniert. Da das entsprechende BamHI-BglII-Fragment von 500 bp Größe auch in den verwandten Regionen Z1 und Z2 (s. Abb. 6) gute Kreuzybridisierung aufweist, sollte dieser Suchklon geeignet sein - abgesehen von der Ursprungsregion Z4 - auch die Regionen Z1 und Z2 zu extendieren. Es ist nicht auszuschließen, daß auch Cosmide, passend auf die Region Z3 isoliert werden könnten. Wie Abb. 6 zeigt, ist diese Region zu den übrigen Mitgliedern der Z-Familie verwandt. Der Bereich, welcher das 500 bp BamHI-BglII-Fragment tragen würde, ist jedoch nicht mehr durch Cosmide repräsentiert.

a)



b)

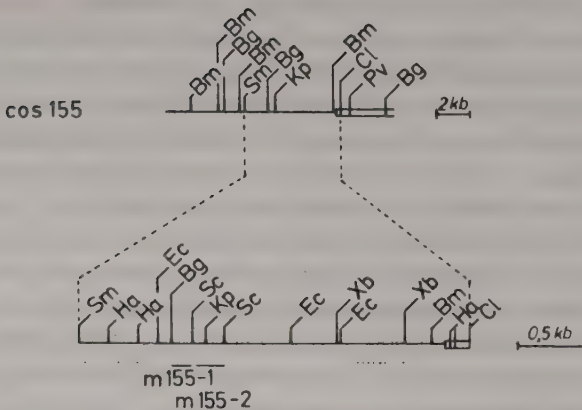


Abb. 7: Konstruktion von Suchklonen zur Extendierung der Z-Regionen im 3'- und im 5'-terminalen Bereich

In Abb. 7a ist die Feinkartierung eines Fragmentes aus cos 158 dargestellt, welches den 5'-terminalen Bereich der Region Z1 repräsentiert. Ein BamHI-XhoI-Fragment von 7,3 kb Größe wurde feinkartiert. Repetitive Sequenzen sind durch punktierte Linien gekennzeichnet.

In Abb. 7b ist ein Anteil des 3'-terminalen Bereiches der Region Z1 dargestellt. Es handelt sich um ein ClaI-SmaI-Fragment von 5,8 kb Größe aus dem Cosmid 155. Repetitive Sequenzen sind mit punktierten Linien markiert.

Tabelle 1: Subklone aus dem Bereich der Z-Regionen

Cosmid	Subklon	Restriktionsenden- des Fragmentes		Fragment- größe (bp)	Vektor- spaltung
		5'	3'		
cos 155	m155-1	SacI	EcoRI	1000	mp10:EcoRI Sac I
cos 155	m155-2	SacI	Sac I	500	mp10: SacI
cos 161	m161-1	BamHI	BglII	500	mp10:BamHI
cos 158	m158-1	HindIII, HindIII		1800	mp10:Hind III
cos 210	m210-1	ClaI	BamHI	2300	mp 8:BamHI AccI

Die Nomenklatur zur Bezeichnung von Subklonen ist unter 7. angegeben.

Entsprechend der Multiplizität der Z-Familie erkannte der Subklon m161-1 in gespaltenen Plazenta-DNA mehrere Fragmente (Spaltung mit BamHI: 4 Banden; BglII: 5; EcoRI: 5) bei sehr unterschiedlicher Bandenintensität. Bei der Hybridisierung aller vorliegenden V_K -Cosmide mit dem Klon m161-1 wiesen nur die Cosmide der Z-Regionen Hybridisierung auf.

Mit Hilfe des präparativ isolierten und hochligierten BamHI-BglII-Fragmentes aus m161-1 wurden die Genbanken IVa und IVb (2.1.) nach den unter 4.2.7. beschriebenen Bedingungen hybridisiert. Es wurden elf Cosmide (cos 517, 518 und cos 664-672) isoliert. Diese enthielten das diagnostische, hybridisierende 500 bp BamHI-BglII-Fragment.

Zur ersten Klassifizierung wurden EcoRI-Einzel- und BamHI-BglII-Doppelspaltungen der DNA dieser Cosmide durchgeführt. Ein Homologievergleich der Bandenmuster und der Größen der Fragmente, welche mit dem Klon m161-1 hybridisieren (Abb. 9), erlaubte eine Einteilung der elf Cosmide in drei Gruppen:

- cos 518, 665, 666, 671 und 672 besitzen dasselbe etwa 15 kb große, mit ml61-1 hybridisierende EcoRI-Fragment und weisen ausgeprägte Homologie in ihren Spaltmustern auf.

- cos 664, 667, 668, 669 und 670 weisen jeweils ein hybridisierendes 8,0 kb großes EcoRI-Fragment auf und gleichen sich sehr in ihren Bandenmustern.

- cos 517 ist als einziges Cosmid durch ein hybridisierendes 6,4 kb EcoRI-Fragment gekennzeichnet. (Die spätere Cosmidkartierung zeigte, daß die Größe des 6,4 kb Fragmentes nicht konstruktionsbedingt ist.)

Durch diagnostische Spaltungen und Kartierungen war zu klären, ob eine oder mehrere Regionen der Z-Familie durch die isolierten Klone extendiert würden. Da keines dieser Cosmide das 1,3 kb BamHI-SmaI-Fragment der Ausgangsregion Z4 (cos 161) aufweist, welches im terminalen Bereich des Cosmids 161 und jenseits der Position des Extensionssuchklons ml61-1 liegt (s. Abb. 6), kann keines der elf Cosmide Region Z4 repräsentieren, bzw. extendieren. Eine Zuordnung von Cosmiden zur Region Z1 (cos 155, Abb. 6) scheidet ebenfalls aus: cos 155 besitzt nämlich ein 6,6 kb großes, mit ml61-1 hybridisierendes EcoRI-Fragment. Keines der isolierten Cosmide zeigt ein entsprechendes Fragment dieser Größe.

Für mögliche Zuordnungen verbleiben die Regionen Z2 und Z3. Zu diesem Zweck wurde jeweils ein Vertreter (cos 517, 666 und 670) aus den drei Gruppen an möglichen Extensionscosmiden kartiert. Die zugehörigen Restriktionskarten sind in Abb. 8 dargestellt. Im Bereich, welcher vom Suchklon ml61-1 erkannt wird, weisen diese Cosmide Homologie auf, allerdings ist im 3'-Bereich dieser Cosmide eine ausgeprägte Divergenz zu erkennen (s. Abb. 8). Ein Vergleich dieser Karten mit denjenigen aus Region Z2 (cos 157, 160) zeigte, daß keines dieser Cosmide eine Extension dieser Region sein sollte. Die Karten von cos 666 und 670 einerseits und cos 160 (Z 2) andererseits weisen zwar im "Überlappungsbereich" große

Ähnlichkeiten auf, allerdings gibt es Unterschiede was die Position von SmaI-Spaltstellen betrifft. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß es sich hierbei um allelische Varianten handelt und somit eines der beiden unterschiedlichen Cosmide (cos 666 oder 670) die Region Z 2 extendiert. (Die Möglichkeit, daß es sich bei den verschiedenen Z-Regionen lediglich um allelische Varianten handelt, ist sehr unwahrscheinlich. Im Laufe der Analyse des V_K -Locus in der Arbeitsgruppe von Prof. Zachau wurden bei allen übrigen V_K -Regionen keinerlei Cosmide gefunden, welche sich einerseits von bereits charakterisierten Regionen unterscheiden hätten und andererseits deutliche Verwandtschaft zu diesen Regionen gezeigt hätten. Daß speziell für die Z-Familie eine Vielfalt von Allelen vorliegen sollte, erscheint somit unwahrscheinlich.)

Möglicherweise extendiert eines der isolierten Cosmide die Region Z 3. In diesem Fall ist ein Vergleich von Restriktionskarten nicht möglich. Es liegen keine Cosmide vor, welche die Region Z 3 in diesem 3'-Bereich noch repräsentieren. Es wäre auch denkbar, daß noch weitere Mitglieder der Z-Familie existieren und daß auf Grund der ausgeprägten Flankenhomologie durch den Suchklon m161-1 deren Flankenbereiche isoliert worden sind.

Da auf den kartierten Cosmiden cos 517, 666 und 670 mit Proben der Subgruppen I, II und III keine hybridisierenden Bereiche nachgewiesen werden konnten und Hinweise für eine Translozierung der Z-Familie vorlagen, wurde die Analyse der isolierten Cosmide nicht weiter betrieben.

2.3.2.1.2. Untersuchungen zur chromosomalen Zuordnung von Mitgliedern der Z-Familie mit Hilfe des Suchklons m161-1

Die verschiedenen Regionen der Z-Familie stellen relativ große Bereiche (Z1, extendiert: 82 kb) dar, tragen aber nur ein V_K -Gen. (Auch Extensionsversuche erbrachten keine Hinweise auf benachbarte V_K -Gensegmente.) Im Gegensatz zu den auf Chromosom 2 lokalisierten V_K -Genen (10), welche nur kleine Abstände (1 - 15 kb) zueinander aufweisen (33, 34, 75, 76, vorl. Arbeit), ist die Singularität der V_K -Gene der Z-Familie sehr ungewöhnlich. Anderer-

seits konnte E. Löttscher für eine Reihe von V_K -Genen eine Translozierung nachweisen (56, 69). Diese V_K -Gene liegen mit einer Ausnahme (56, 63) ebenfalls isoliert vor. Aus diesem Grund wurden Versuche durchgeführt, die eine Aussage über die Frage möglich machen sollten, ob auch die Mitglieder der Z-Familie transloziert sind.

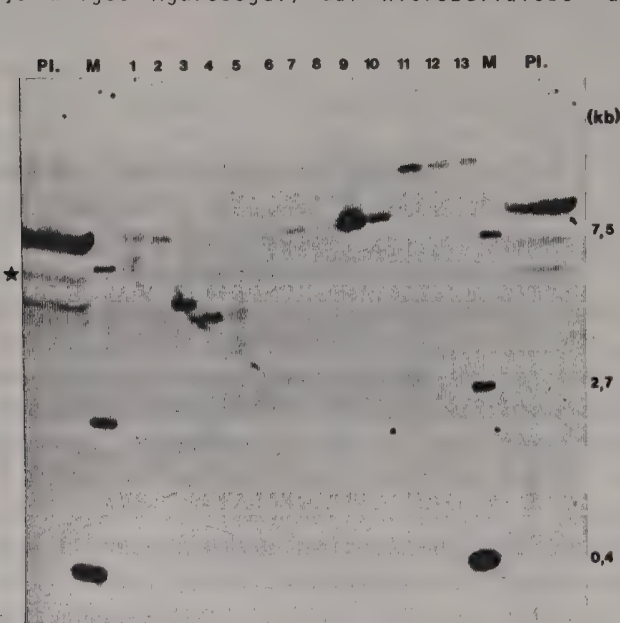
DNAs von 29 Zellhybriden (27 Maus-Mensch- und 2 Chinesischer Hamster-Mensch-Zelllinien; Ref. 56, 77) - gespalten mit dem Restriktionsenzym EcoRI und anschließend auf Nitrozellulosefilter transferiert - waren freundlicherweise von K.-H. Grzeschik (Universität Münster) zur Verfügung gestellt worden. Die Hybridisierung mit dem Extensionssuchklon ml61-1 führte E. Löttscher durch (69). Entsprechend früheren Untersuchungen zur Bestimmung der Kopienzahl dieser klonierten Sequenz (vorl. Arbeit, 2.3.2.1.1.) wurden fünf verschieden große, hybridisierende EcoRI-Fragmente von 15, 7.3, 6.6, 6.4 und 6.3 kb Länge identifiziert. Die Datenauswertung durch K.-H. Grzeschik und E. Löttscher (pers. Mitteilung) ergab, daß das hybridisierende Fragment von 7.3 kb Länge auf Chromosom 2 liegt. Eine Zuordnung zu bestimmten Chromosomen war bei den anderen Fragmenten aufgrund von Mehrdeutigkeiten nicht möglich.

Falls eine der vorliegenden Z-Regionen oder Cosmide, welche mit Hilfe des Klonen ml61-1 isoliert worden waren, ein hybridisierendes EcoRI-Fragment von 7.3 kb Größe enthält, könnte eine Zuordnung dieser Region zu Chromosom 2 getroffen werden. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgender Versuch durchgeführt: DNAs von Cosmiden der Regionen Z 1 bis Z 4, welche die 3'-Flanken dieser Regionen darstellen und die DNAs der Cosmide, die mit Hilfe des Klonen ml61-1 isoliert worden waren, wurden mit dem Restriktionsenzym EcoRI gespalten und auf Nitrozellulose transferiert. Die Hybridisierung mit dem Klon ml61-1 zeigte (Abb. 9), daß keines der vorliegenden Cosmide ein hybridisierendes EcoRI-Fragment dieser Größe aufweist und somit keines eindeutig Chromosom 2 zugeordnet werden kann.

Was die vorliegenden Regionen der Z-Familie angeht, kann man zwar nicht ausschließen, daß Mitglieder auf Chromosom 2 lokalisiert sind. Es ist jedoch eher wahrscheinlich, daß diese Regionen auf beliebige Chromosomen transloziert sind. Eine Zusammenfassung aller Hinweise für diese Annahme ist unter Berücksichtigung der Daten aus 2.3.2.2. unter 2.3. angegeben.

Abb. 9: Versuch einer chromosomalen Zuordnung der Mitglieder der Z-Familie mit Hilfe des Suchklons m161-1 (Z4)

Dargestellt ist die Autoradiographie von Plazenta-DNA, bzw. von Cosmid-DNAs, die mit dem Suchklon m161-1 stringent hybridisiert worden waren (0,5 x SSC, 68°C im letzten Waschschrift). Die mit EcoRI gespaltenen DNAs waren nach elektrophoretischer Auftrennung (0,5 %-iges Agarosegel) auf Nitrozellulose "Gene Screen", NEN



transferiert worden. Zu beiden Seiten ist Plazenta-DNA ("Pl.") aufgetragen. Von den fünf Fragmenten, die der Klon m161-1 erkennt, ist dasjenige von 7,3 kb Länge mit einem Stern markiert. Dieses Fragment ist Chromosom 2 zugeordnet (2.3.2.1.2.). Auf den Hybridisierungsmarker ist mit dem Buchstaben "M" hingewiesen, die Größen der Markerbanden sind am Rand (rechts) in kb angegeben. In den Spuren 1 bis 13 sind

folgende, mit EcoRI gesplattene Cosmide aufgetragen: 1: cos 159; 2: cos 160; 3: cos 155; 4: cos 517; 5: cos 666; 6: cos 667; 7: cos 668; 8: cos 670; 9: cos 664; 10: cos 669; 11: cos 665; 12: cos 671; 13: cos 518. (Die in den Cosmiden vorliegende, klonierte Plazenta-DNA (Individuum St) und die mit "Pl." gekennzeichnete Plazenta-DNA (Indiv. AM) stammen nicht vom gleichen Individuum. Bei den Fragmenten der Cosmide der Spuren 11-13 sollte es sich um allelische Varianten handeln.)

2.3.2.2. Extendierung von Regionen der Z-Familie im 5'-Bereich und Versuche zur chromosomalen Lokalisierung dieser Regionen

Auch für den 5'-Bereich wurde eine Extendierung der Z-Regionen unternommen. Diese weisen dort - ebenso wie in den 3'-Flankenbereichen - deutliche Homologie auf (s. 2.3.1.). Aus diesem Grund wurde versucht, spezifische Suchklone herzustellen, welche (terminale) Sequenzbereiche verwandter Z-Regionen bei guter Kreuzhybridisierung erkennen. Eine Extendierung mehrerer Z-Regionen mit nur wenigen Suchklonen erschien dadurch möglich. Diese Suchklone sollten auch für eine chromosomale Zuordnung einzelner Regionen verwendbar sein.

2.3.2.2.1. Extension der Region Z1 im 5'-Bereich mit Hilfe des Suchklons m158-1

Für die Konstruktion eines geeigneten Suchklons wurde zunächst ein 7,3 kb großes XhoI-BamHI-Fragment aus cos 158 (Z1) präparativ isoliert und anschließend feinkartiert (Abb. 7a). Bereiche mit repetitiven Sequenzen wurden durch Hybridisierung mit radioaktiv markierter Plazenta-DNA identifiziert. Ein 1,8 kb großes HindIII-Fragment wurde in M13 mp10 kloniert (m158-1) und konnte möglicherweise als Extensionssuchklon dienen. Die Bestimmung der Kopienzahl dieser klonierten Sequenz ergab, daß diese in mehreren Kopien (mindestens fünf) im Genom vorliegt (s. Abb.10). Da einerseits die Hybridisierung unter nichtstringenten Bedingungen ausgeführt worden war (3 x SSC, 68°C im letzten Waschschrift), um auch verwandte, kreuzhybridisierende Sequenzen nachzuweisen und da die untersuchte Region an sich schon in mehreren Kopien existiert (Z1 - Z4), war es nicht überraschend, daß bei verschiedenen DNA-Spaltungen in den Autoradiogrammen jeweils mehrere Hybridisierungsbanden nachgewiesen werden konnten.

Nach der unter 2.3.2 erläuterten Vorgehensweise (Hybridisierung von Cosmiden, die alle bisher in der Arbeitsgruppe klonierten Regionen des V_K -Locus repräsentieren, mit Extensionssuch-

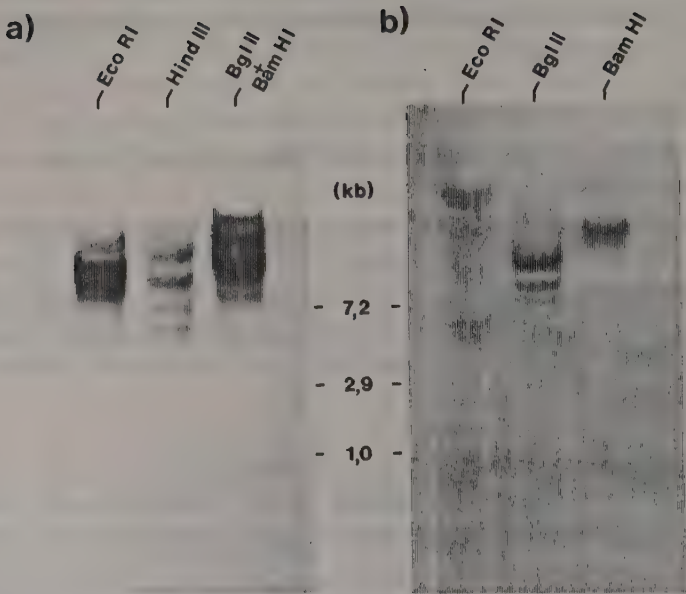


Abb. 10: Bestimmung der Kopienzahl der in den Extensionssuchklonen m158-1 und m210-1 vorliegenden, klonierten Sequenzen

In Abb. 10a ist das Autoradiogramm der Hybridisierung von Plazenta-DNA (Indiv. AM) mit dem Klon m158-1 dargestellt. Die gespaltene DNA war auf einem 0,8 %-igen Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und nichtstringent hybridisiert worden (3 x SSC, 68°C im letzten Waschschrift).

In Abb. 10b ist das Ergebnis des entsprechenden Versuches mit dem Suchklon m210-1 dargestellt. Es handelte sich um dieselben Versuchsbedingungen und dieselbe Plazenta-DNA. Die Fragmentgrößen eines nicht abgebildeten Markers sind am Rand der Autoradiogramme in kb angegeben.

klonen) wurde überprüft, ob der Klon m158-1 aus der Region Z1 auch andere Mitglieder der Z-Familie erkennt. In Übereinstimmung zur Flankenhomologie (Restriktionsspaltstellen) wurde eine Kreuzhybridisierung für die Region Z3 (cos 110) auf einem 6,3 kb großen XhoI-BamHI-Fragment nachgewiesen. (Die Region Z2 ist an der ent-

sprechenden Position nicht mehr durch Cosmide repräsentiert, bei Region Z4 liegt ein Abbruch in der Homologie in der 5'-Flanke vor; s. Abb. 6)

Nach Hybridisierung der Genbanken IVa und IVb (2.1.) mit dem Extensionssuchklon m158-1 (als Probe wurde das aus dem Klon präparativ isolierte Fragment in hochligierter Form eingesetzt) wurden 32 Klone isoliert. Die Cosmidklone cos 691 und 692 konnten der Ursprungsregion Z1 zugeordnet werden und erbrachten eine Extension (Abb. 6 und 11) von 13 kb. Mit Ausnahme des Cosmids cos 691, welches weit mit dem Ausgangscosmid cos 158 aus Z1 überlappt, zeigte keines dieser 32 Cosmide bei der Hybridisierung mit Proben der Subgruppen I, II und III ein Signal.

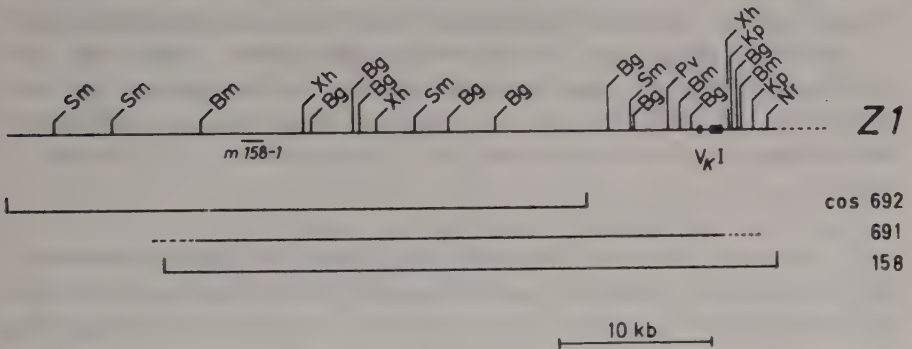


Abb. 11: Extension der Region Z1 in 5'-Richtung durch "chromosomal walking"

Dargestellt ist der 5'-Abschnitt der Region Z1. Durch Einsatz der Technik des "chromosomal walkings" wurden ausgehend von cos 158 mit Hilfe des Suchklons m158-1 die zwei extendierenden Cosmide, cos 692 und 691 isoliert. Der Bereich von cos 691 wird von cos 692 und cos 158 völlig abgedeckt. Die gestrichelten Linien weisen darauf hin, daß Anfangs- und Endpunkt von cos 691 nicht genau festgelegt wurden. Durch ausgefüllte Balken sind die codierenden Bereiche des V_KI-Gens markiert. Die Fortsetzung der Region Z1 durch cos 155 (Abb. 6) ist durch die gestrichelte Linie in der Restriktionskarte symbolisiert.

Die isolierten Cosmide konnten in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Als Kriterium diente dabei einerseits die Größe des jeweiligen HindIII-Fragmentes, das mit dem Klon m158-1 hybridisierte, und andererseits der Vergleich von Fragmentmustern, die aus Einzelspaltungen erhalten worden waren. Folgende Einteilung wurde getroffen:

1. Cosmide, die das 1,8 kb HindIII-Fragment - entsprechend der Ursprungsregion Z1 - enthalten:

a) cos 691 und 692 extendieren cos 158, bzw. Region Z1

b) cos 546-556, cos 687-690 und cos 693, 694 weisen zwar ein hybridisierendes HindIII-Fragment von 1,8 kb Größe auf, extendieren aber nicht die Region Z1, da diese Klone für Z1 typische Spaltfragmente aus dem 5'-terminalen Bereich nicht aufweisen: Erstens liefert keines dieser Cosmide bei der SmaI-Spaltung ein 3,8 kb großes Fragment, wie es das extendierende Cosmid 692 im extendierten Bereich zeigt (s. Abb. 11). Zweitens fehlen die im terminalen 5'-Bereich der Z1-Region liegenden, folgenden Spaltfragmente: 0,8 kb XhoI-BglII; 3,0 kb BglII; 0,5 kb XhoI-BglII.

2. Cosmide, die zwar ein mit dem Klon m158-1 hybridisierendes HindIII-Fragment besitzen, welches aber eine andere Größe als 1,8 kb aufweist:

Cosmide, gekennzeichnet durch hybridisierende Fragmente, welche kleiner als 1,8 kb sind:

cos 557, 558, 695, 696	1,6 kb
cos 559	1,4 kb
cos 560	1,3 kb

Cosmide mit hybridisierenden HindIII-Spaltfragmenten, die größer als 1,8 kb sind:

cos 697	2,5 kb
cos 561-566	15 kb

Eine Zuordnung dieser Cosmide zu den 5'-Flanken der anderen Mitglieder der Z-Familie (Z2-Z4) war nicht möglich. Keines dieser Cosmide kann Region Z3 extendieren. Dieses besitzt nämlich ein HindIII-Fragment von etwa 10 kb Größe, welches mit dem Suchklon m158-1 hybridisiert, während keines der isolierten Cosmide ein Fragment dieser Größe zeigt. Ein Anschluß von Cosmiden an die Region Z4 scheidet ohnehin aus, da im entsprechenden 5'-Bereich dieser Region eine völlig veränderte 5'-Flanke vorliegt, die keinerlei Verwandtschaft zu Z1,2 und 3 zeigt (s.2.3.1. und 2.3.2.2.2.). Möglich wäre, daß einige der isolierten Klone die Region Z2 extendieren. Da jedoch diese Region im entsprechenden Bereich nicht durch Cosmidklone repräsentiert ist (Abb. 6), fehlen die Vergleichsdaten, die eine Zuordnung erlauben würden. Denkbar wäre auch, daß noch eine Reihe weiterer Mitglieder der Z-Familie existiert und daß die Extensionen von deren homologen 5'-Flanken isoliert worden sind.

Mit Hilfe des Suchklones m158-1 wurde im Rahmen dieser Arbeit der Versuch unternommen, chromosomale Zuordnungen zu treffen (Hybridisierungen von DNAs aus Hybridzelllinien (s. 2.3.2.1.2.) mit dem Suchklon m158-1). Entsprechende Versuche wurden auch mit dem Suchklon m210-1 (Z4; 2.3.2.2.2.) durchgeführt. Die Ergebnisse sind zusammenfassend unter 2.3.2.2.3. beschrieben.

2.3.2.2.2. Extensionsversuche im 5'-Bereich der Region Z4 mit Hilfe des Suchklons m210-1

Wie bereits erläutert (2.3.1.), zeigt ein Vergleich der Restriktionskarten der Z-Familie, daß die verschiedenen Regionen ausgeprägte Homologie aufweisen. Lediglich der 5'-Bereich der Region

Z4 weist keinerlei Ähnlichkeit mit den entsprechenden Flankenabschnitten der anderen Z-Regionen auf. Der ungefähre Beginn des Homologieabbruches bei Z4 ist in Abb. 6 gekennzeichnet.

Zum Zwecke der Extension von Region Z4, wurde der Extensionssuchklon m210-1 hergestellt (Abb. 6; Tab. 1). Das 2,8 kb große BamHI-ClaI-Fragment aus dem terminalen 5'-Bereich von cos 210 ist frei von repetitiven Sequenzen (kein Signal bei Hybridisierung mit radioaktiv markierter Plazenta-DNA). Die Bestimmung der Kopienzahl der klonierten Sequenz zeigte, daß diese Sequenz - ebenso wie diejenigen aus m158-1 und m161-1 - in mehreren Kopien (mindestens sechs) im Genom vorliegt (Abb.10). Bei der Hybridisierung von Cosmiden, welche den bisher von der Arbeitsgruppe klonierten V_K -Locus repräsentierten, mit dem Suchklon m210-1 zeigte nur das Ursprungscosmid (cos 210 aus Z4) ein Signal.

Für die Hybridisierung der Genbanken IVa und IVb (2.1.) wurde lediglich ein reduzierter Anteil der in m210-1 klonierten Sequenz eingesetzt. Das 2,8 kb große BamHI-ClaI-Fragment enthält eine interne HindIII-Spaltstelle. Da eine weitere HindIII-Stelle in der Klonierungsregion des M13-Phagenvektors mp8 gegeben ist, konnte durch Einfachspaltung mit HindIII ein 1,0 kb großes Fragment isoliert werden. Dieses wurde in hochligierter Form zur Untersuchung der Genbanken eingesetzt.

Eine Reihe von Cosmiden (41 Cosmide) wurde isoliert. Wie die Hybridisierung mit Proben der V_K -Subgruppen I, II und III zeigte, besitzt keines dieser Cosmide ein V_K -Gensegment (2 x SSC, 68°C im letzten Waschschrift). Die DNAs der isolierten Klone wurden einer BamHI-ClaI-Doppelspaltung. bzw. einer BglII-Einzelspaltung unterworfen. Erstere gab nach Transfer auf Nitrozellulose und Hybridisierung mit dem Suchklon m210-1 Aufschluß über die Größe des hybridisierenden Fragmentes. Die BglII-Spaltung lieferte zusätzliche, diagnostische Spaltprodukte aus dem 5'-terminalen Bereich (0,7 kb; 6,0 kb; 1,9 kb).

Eine Aufteilung der 41 Cosmide in einzelne Gruppen wurde vorgenommen:

1. Cosmide, die das 2,8 kb große BamHI-ClaI-Fragment der Ursprungsregion Z4 (cos 210) enthalten:

cos 521, 527, 531, 535 und 677. Keines dieser Cosmide besitzt jedoch eines der diagnostischen BglII-Spaltfragmente aus dem terminalen 5'-Bereich von cos 210. Dies könnte bedeuten, daß diese fünf Cosmide (cos 531 ist, was das Fragmentmuster der BglII-Einzelspaltungen betrifft, mit cos 677 nahezu identisch) die Region Z4 nur sehr knapp überlappen, bzw. sehr weit extendieren müßten. In diesem Falle müßten diese fünf, bzw. vier Klone ihrerseits sehr ähnliche Fragmentmuster in der BglII-Spaltung aufweisen, falls die gleiche Region repräsentiert wird. Man findet jedoch, daß cos 521, 531 (bzw. 677) zwar gute Homologie zeigen, daß sich aber die Muster von cos 527 und 535 deutlich von diesen und auch ihrerseits unterscheiden. Es liegen somit mindestens drei unterschiedliche Varianten vor. Eine Kartierung dieser Cosmide hätte in diesem Fall keine Klärung der Zuordnung erlaubt, da bei der potentiellen Überlappung mit dem Ausgangscosmid cos 210 zu wenig Vergleichsdaten vorgelegen wären. Lediglich eine Sequenzierung homologer Sequenzbereiche, sowohl bei der Ausgangsregion Z4 als auch bei den Extensionscosmiden, hätte eine Zuordnung erlaubt. Da jedoch kein weiteres V_K -Gen im möglichen Extensionsbereich liegt und außerdem die Z-Familie mit großer Wahrscheinlichkeit transloziert auf verschiedenen Chromosomen vorliegt, wurde auf eine eindeutige Zuordnung verzichtet.

2. Cosmide, die ein mit dem Suchklon hybridisierendes BamHI-ClaI-Fragment einer anderen Größe als 2,8 kb tragen:

cos 519, 520	2,5 kb
cos 528, 537	3,3 kb
cos 683	5,0 kb
cos 534, 536	6,0 kb
cos 543	7,0 kb

cos 522-526, 529, 530, 532,
533, 537-542, 544, 545, ≥ 10 kb
673-676, 678-682, 684-686

Um diese Cosmide in Beziehung zur Ausgangsregion Z4 zu setzen, gibt es verschiedene Erklärungen:

a) Es sind verschiedene allelische Varianten der Region Z4 gefunden worden.

b) Es wäre denkbar, daß mehr als eine Kopie der Region Z4 existiert. Möglicherweise stellen die vier Cosmide (cos 210, 161, 156, 155), welche die Region Z4 darstellen, nicht eine, sondern mehrere, sehr ähnliche Kopien vom Typ der Region Z4 dar. In der näheren Umgebung des V_K -Gens wären diese Regionen zu ähnlich, als daß man sie durch Restriktionskartierung unterscheiden könnte. Erst in den fernen Flankenbereichen würden merkliche Divergenzen zu finden sein.

c) Der Suchklon m210-1 trägt eine Sequenz, die in mehreren Kopien im Genom vorliegt und ähnlich wie die L-Sequenzen (78) manchmal in Kombination mit V_K -Genen, manchmal völlig isoliert, ohne irgendeine Kopplung an V_K -Gene, vorkommt.

2.3.2.2.3. Untersuchungen zur chromosomalen Zuordnung von Regionen der Z-Familie mit Hilfe der Suchklone m158-1 (Z1) und m210-1 (Z4)

Die Extensionsversuche bei den Regionen Z1-Z4 waren zwar im Falle der Region Z1 erfolgreich, führten aber zu keiner Verknüpfung dieser singulären V_K I-Genregionen mit anderen V_K -Genloci. Da bereits Translokierung von V_K -Genen nachgewiesen worden war (56) und Ähnlichkeiten in der Genomstruktur dieser Bereiche mit denjenigen der Z-Familie zum Teil bestehen (2.3.1.), wurden Versuche zur chromosomalen Zuordnung der Z-Familienmitglieder mit Hilfe der Suchklone m158-1 und m210-1 unternommen.

Nitrozellulosefilter mit DNAs von Zellhybriden (Maus-Mensch, chines. Hamster-Mensch; 2.3.2.1.2.; Ref. 56, 77) waren freundlicherweise von K.-H. Grzeschik (Universität Münster) zur Verfügung gestellt worden. Es handelte sich um EcoRI gespaltene DNAs. Sowohl mit dem Suchklon m158-1 (Z1) als auch dem Klon m210-1 (Z4) wurden Hybridisierungen durchgeführt. Das Autoradiogramm der Hybridisierung mit m158-1 ist in Abb. 12 dargestellt.

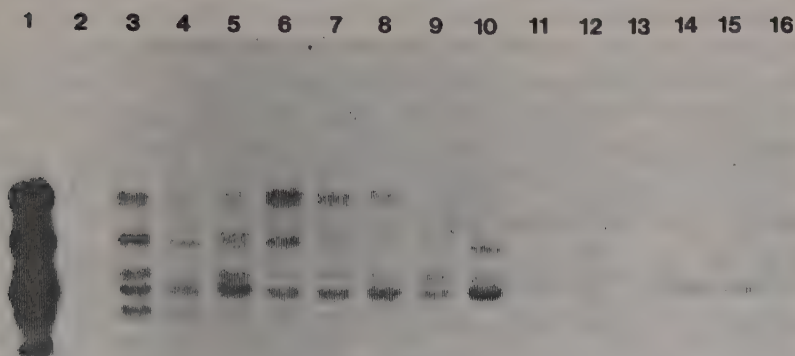


Abb. 12: Versuch einer chromosomalen Zuordnung von Mitgliedern Z-Familie mit Hilfe des Extensionssuchklons m158-1 (Z1) durch Hybridisierung von DNAs von Zellhybriden

Dargestellt ist das Autoradiogramm der Hybridisierung von DNAs von Zellhybriden mit dem Klon m158-1. Die DNAs waren mit EcoRI gespalten, auf einem 0,8 %-igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Biodyne A-Membran transferiert worden. (Der Filter war freundlicherweise von K.-H. Grzeschik, Univ. Münster, zur Verfügung gestellt worden.) Die Hybridisierung erfolgte stringent (0,5 x SSC, 68°C im letzten Waschschrift). Das Schema zur Aufschlüsselung, welche Chromosomenkombinationen in den Spuren 3-12 und 14-16, bzw. den jeweiligen Zellhybriden, vorliegen, ist unter Ref. 69 angegeben. Spur 1 dient als Referenz: hierbei handelt es sich nur um Human-DNA (Zelllinie GM 3104). Die Spuren 2 und 13 dienen zur Kontrolle: Spur 2 enthält nur Maus-DNA, Spur 13 nur Hamster-DNA. Beide ergeben bei Einsatz der Probe m158-1 erwartungsgemäß keine Kreuzhybridisierung. In Spur 11 war nur sehr wenig DNA aufgetragen.) In allen anderen Spuren ist DNA aus Maus-Mensch, bzw. chines. Hamster-Mensch-Zellhybriden aufgetragen.

Die gespaltene DNA weist eine Reihe von unterschiedlich stark hybridisierenden Fragmenten auf. Dies steht in Übereinstimmung mit der bereits unter 2.3.2.1.1. beschriebenen Kopienzahlbestimmung der Sequenz aus m158-1 (Abb. 10). Kreuzhybridisierung zu Maus-DNA (Spur 17) oder Hamster-DNA (Spur 13) ist nicht gegeben. In fast allen Spuren mit DNAs aus Zellhybriden war das nahezu vollständige Bandenmuster zu finden, wie es die als Referenz dienende Gesamthuman-DNA (Spur 1) auch zeigte. Aus diesem Grund war im Falle des Klon m158-1 eine Zuordnung einzelner Banden zu bestimmten Chromosomen nicht möglich.

Nach Abwaschen der Filter mit Formamid (50 %-ig, v/v; 68°C) und einer Probeautoradiographie, die keinerlei Hintergrundsignale der vorausgegangenen Hybridisierung mehr zeigte, wurde mit dem Klon m210-1 (Z4) der entsprechende Versuch durchgeführt. Die Autoradiographie des hybridisierten Filters wies für Human-DNA eine Reihe von Banden unterschiedlicher Stärke auf (EcoRI-Spaltung). Auch bei diesem Experiment war bei fast allen Spuren mit DNAs von Zellhybriden nahezu das komplette Bandenmuster der Humanreferenz zu finden. Eine Zuordnung einzelner Banden zu bestimmten Chromosomen war auch in diesem Falle nicht möglich. Vielmehr kann man davon ausgehen, daß die Z-Familie über mehrere Chromosomen verstreut vorliegt. Aufgrund der Überlagerung der Signale, kommt es zu Mehrdeutigkeiten, die eine Zuordnung zu bestimmten Chromosomen nicht mehr gestatten.

Es muß noch erwähnt werden, daß sowohl für cos 158 (Z1) als auch cos 210 (Z4) die Größen der EcoRI-Fragmente, auf welchen jeweils die Sequenz der entsprechenden Suchklone liegt, bestimmt worden waren. Nur so hätte überhaupt eine Zuordnung dieser Regionen zu bestimmten Chromosomen über die Zuordnung von Hybridisierungsbanden getroffen werden können. Im Falle des Cosmids 210 wurde das gesamte Cosmid mit EcoRI nachkartiert. Das EcoRI-Fragment, welches das 2,8 kb große BamHI-ClaI-Fragment des Suchklons m210-1 trägt, ist 15 kb groß, wobei jedoch eine der EcoRI-Spaltstellen bereits im Vektorbereich liegt. Berücksichtigt man den Anteil von pHC 79, so bleiben 14,5 kb als Mindestlänge für das entsprechende EcoRI-Fragment. Für cos 158 (Z1) wurde eine EcoRI-Spaltung der Cosmid-DNA vorgenommen. Nach dem Transfer der DNA

auf Nitrozellulose wurde mit dem radioaktiv markierten Klon m158-1 hybridisiert und die Länge des hybridisierenden Fragmentes auf 10 kb bestimmt. (Da aufgrund der Feinkartierung die 5'-terminale EcoRI-Spaltstelle bekannt ist (Abb. 7a), kann keine der Spaltstellen aus dem Vektorbereich stammen.)

2.3.3. Zusammenstellung der Hinweise, die auf eine Translozierung von Regionen der Z-Familie hinweisen

Eines der Ziele der Arbeitsgruppe von Prof. Zachau ist es, die V_K -Multigenfamilie des Menschen strukturell zu analysieren. Aufgrund von Untersuchungen von Malcolm (10) wurden die V_K -Gene des Menschen Chromosom 2 zugeordnet. E. Löttscher konnte jedoch zeigen (56), daß einige V_K -Gene auch transloziert auf andere Chromosomen vorkommen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die V_K -Gene der Z-Familie unter dem Gesichtspunkt der Strukturanalyse und der chromosomalen Zuordnung behandelt. Im Falle der Z-Familie liegt jedoch eine sehr komplexe Situation vor. Aufgrund der ausgeprägten Flankenhomologien der verschiedenen Mitglieder dieser Familie waren keine Proben herstellbar, die absolut spezifisch für einzelne Z-Regionen gewesen wären. Verschiedene Versuche einer chromosomalen Zuordnung der Z-Regionen wurden unternommen. Obwohl zwar kein Beweis für eine Translozierung von Z-Regionen möglich war, liegt eine Reihe von Hinweisen vor, die für eine Translozierung sprechen.

1. Bei den Z-Regionen handelt es sich um isolierte V_K -Gene, die auf relativ großen charakterisierten Bereichen liegen (21: 82 kb). Im Gegensatz dazu haben alle bisher analysierten V_K -Gene, die auf Chromosom 2 im V_K -Locus liegen (28, 33, 34, 75, 76, vorl. Arbeit), geringe Abstände zueinander.

2. V_K -Gene, deren Translozierung klar gezeigt werden konnte (56), liegen mit Ausnahme der Region "Chr 22", ebenfalls als isolierte V_K -Gene vor.

3. Versuche zur chromosomalen Zuordnung von Z-Regionen wurden unternommen. Aufgrund von Mehrdeutigkeiten war eine Zuordnung einzelner Regionen zu bestimmten Chromosomen nicht möglich. Nimmt man aber an, daß die drei verwendeten Proben spezifisch für die Z-Familie sind, so sprechen diese Ergebnisse für eine Translozierung der Mitglieder der Z-Familie. Die Tatsache, daß ein Suchklon auch verwandte Z-Regionen erkennt, würde die Mehrdeutigkeit bei der Zuordnung zu Chromosomen erklären.

4. Translozierte V_K -Gene sollten nach den unter 2.3. angegebenen Gründen als Pseudogene einzustufen sein. Von Genen, die keinem Selektionsdruck mehr unterliegen, würde man Veränderungen durch Mutationen erwarten. Ein Mitglied unserer Arbeitsgruppe konnte für das V_K -Gen der Region Z1 eine Reihe von Mutationen nachweisen, die dieses Gen eindeutig als Pseudogen ausweisen (R. Thiele, unveröffentlicht).

5. Für die Entstehung der Z-Familie kann man einen Amplifikationsmechanismus annehmen (3.6.), der die Translozierung dieser V_K -Gene beschreibt. In Übereinstimmung mit diesem Amplifikationsmodell wurde gefunden, daß erstens besonders viele Cosmide isoliert wurden, die der Z-Familie zuzurechnen sind; zweitens, daß mit den drei Extensionssuchklonen jeweils verschiedene Gruppen an Cosmiden gefunden wurden; drittens, daß diese Extensionssuchklone jeweils mehrere hybridisierende Banden in gespaltenen Plazenta-DNA erkannten, wobei die Zahl dieser Banden in etwa gleich war, nämlich zwischen 5 und 10.

6. Hybridisierungsversuche von gespaltenen, hochmolekularer DNA, die mit Hilfe der Puls-Feld-Gel-Elektrophorese aufgetrennt worden war, ergaben keinerlei Hinweise auf eine Kopplung der Z-Regionen mit denjenigen Regionen, die aus dem V_K -Locus stammen (2.6.5.). Bei einer (engen) Kopplung der Z-Regionen an V_K -Regio-

nen von Chromosom 2 hätte man hybridisierende große Fragmente gleicher Länge erwarten können, wie dies beispielsweise bei den A-, L- und O-Regionen der Fall war (2.6.3.)

Eine Translozierung der Z-Familie erscheint als sehr wahrscheinlich. Daß einige Mitglieder dieser Familie auf Chromosom 2, möglicherweise im V_K -Locus, liegen, ist allerdings nicht auszuschließen.

2.4. Analyse der A-Regionen (Aa, Ab), zweier genreicher, durch Duplikation auseinander hervorgegangenen Regionen des V_K -Locus

Im Laufe der Strukturanalyse der V_K -Multigenfamilie des Menschen sind in der Arbeitsgruppe von Prof. Zachau verschiedene V_K -Regionen charakterisiert worden, die eine Reihe von V_K -Gensegmenten tragen (32, 33, 34, 75, vorl. Arbeit) und auf Chromosom 2 lokalisiert sind (69). Zwei dieser Regionen, nämlich die Regionen Aa und Ab, wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals analysiert. Es wurde gefunden, daß es sich bei diesen um genreiche (bisher 28 V_K -Gensegmente) Regionen handelt, die durch Duplikation einer Ursprungsregion (A-Region) auseinander hervorgegangen sind. Alle V_K -Gensegmente der A-Regionen weisen dieselbe 5'-3'-Polarität auf.

2.4.1. Charakterisierung des Kernbereiches der A-Regionen

Bei der Suche nach Cosmiden, die V_K -Gene tragen, waren durch Einsatz der V_K I-spezifischen Probe ml-3 (66) von H.-D. Pohlentz aus der Genbank IIIa (55) u.a. auch die Cosmidklone cos 142 und cos 163 isoliert worden. Ähnlichkeiten der Fragmentmuster von verschiedenen Einzelspaltungen dieser beiden Klone wiesen auf eine mögliche Überlappung dieser Cosmide hin.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst die Restriktionskarten beider Cosmide erstellt (Abb. 13). Cos 142 und 163 bilden den Kernbereich der A-Regionen. (In Abb. 16 und 20 sind die extendierten A-Regionen dargestellt.) Eine Überlappung der klonierten Bereiche in cos 142 und 163 war zwar zu finden. Die beiden Cosmide weisen in einem Bereich von 15 kb nahezu vollständige Übereinstimmung auf, was die Abfolge und den Abstand der Restriktionsspaltstellen, die Verteilung der repetitiven Sequenzen und die Lokalisierung der V_K -Gensegmente in diesem Bereich angeht. Allerdings unterscheiden sich die beiden Restriktionskarten hinsichtlich einer SmaI-Spaltstelle (Abb. 13). Außerdem findet man, daß ein BglII-EcoRV-Fragment (im Überlappungsbereich) aus Ab im

Tabelle 2: Erläuterungsschlüssel zu den mit Zahlen gekennzeichneten Genen der A-Regionen Aa und Ab

Nummer des Gens		Subgruppe	Sequenzanalyse (Zitate)

Aa	1	II	-
	2	II	-
	3	II	+ (v. A.)
	4	I	+ (v. A.)
	5	II	+ (57)
	6	III	-
	7	II	-
	8	II	-
	9	I	-
	10	I/III (?)	+ (v. A.)
	11	III	+ (69)
	12	II (?)	-
	13	II	-
	14	I	-
Ab	15	II	-
	16	II	-
	(17)		
	(18)		
	19	II	-
	20	III	+ (v. A.)
	21	II	+ (57)
	22	II	-
	23	I	-
	24	I/III (?)	-
	25	III	-
	26	II (?)	+ (v. A.)
	27	II	-
	28	I	-

Bei den mit einem Fragezeichen versehenen Subgruppenangaben war eine eindeutige Subgruppenklassifizierung nicht möglich. Eventuell handelt es sich bei diesen V_K -Genen um Vertreter neuer Subgruppen (2.5.2.3.). Die Abkürzung V_K "v. A." steht für "vorliegende Arbeit". Die Gene der A-Regionen sind im Text mit dem Großbuchstaben A und der entsprechenden Zahl bezeichnet. Bei V_K -Genen, bei denen eine Sequenzanalyse vorliegt, ist in Spalte 3 ein Kreuzsymbol vermerkt. Die in Klammern angegebenen Gene A17 und A18 sind bisher noch nicht auf Cosmiden repräsentiert.

Vergleich zu dem entsprechenden Fragment aus Aa um etwa 700 bp größer ist (Abb. 18). (Möglicherweise handelt es sich im Falle von Aa um die Deletion eines Sequenzbereiches oder in Ab hat die Insertion eines DNA-Stückes stattgefunden.) Wie unter 2.4.3. gezeigt wird, handelt es sich bei den durch cos 142 und 163 dargestellten Bereichen nicht um allelische Varianten, sondern um die Duplikation einer Region des V_K -Locus (Aa, Ab), wobei cos 142 einen Teil der Region Aa und cos 163 ein Stück der Region Ab darstellt.

Mit Proben der Subgruppen I, II und III wurden auf den durch cos 142 und 163 repräsentierten Bereichen insgesamt 10 V_K -Gensegmente nachgewiesen und lokalisiert (Abb. 13, Tab. 2). Mit einer Probe der Subgruppe IV wurde keine Hybridisierung gefunden. Die V_K -Gene haben Abstände von 1 bis 15 kb zueinander. Von Gen A24 ist im 3'-terminalen Bereich von cos 163 lediglich ein Teil repräsentiert (Signalsequenz und Intron), wie Feinkartierungen (2.4.2.2., Abb. 17) und Hyybridisierungen zeigten.

Bei cos 142 wurde nach Hybridisierung von der gespaltenen und auf Nitrozellulose transferierten Cosmid-DNA mit der V_K I-Probe m1-3 (66) nach längerer Exposition für das 5'-terminale BamHI-Fragment (3,4 kb) ein sehr schwaches Signal gefunden (2 x SSC, 68°C im letzten Waschschrift). Da cos 142 eine Reihe von V_K -Gensegmenten trägt und die Zuverlässigkeit von sehr schwachen Hybridisierungssignalen erst nach der Reinigung des betreffenden DNA-Fragmentes durch Subklonierung überprüft werden konnte, wurde das 3,4 kb große Fragment isoliert, in M13 mp8 subkloniert (m142-1), feinkartiert (Abb. 14) und die DNA dieses Fragmentes mit Proben der vier V_K -Subgruppen hybridisiert (2 x SSC, 68°C im letzten Waschschrift). Das gereinigte Fragment zeigte keinerlei Hybridisierungssignal mehr. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um kleine Sequenzbereiche, die sehr schwache Kreuzhybridisierung mit V_K -Proben zeigen, jedoch keine signifikante Homologie zu V_K -Genen aufweisen. Dies wurde auch für die Sequenz aus m142-30 (2.5.2.5.) gefunden. (Im Falle des Gen A 20 lag eine ähnliche Problemstellung vor. Hierbei konnte jedoch nach Subklonierung, Hybridisierung und Sequenzierung ein stark verändertes V_K III-Pseudogen nachgewiesen werden; s. 2.5.2.4.)

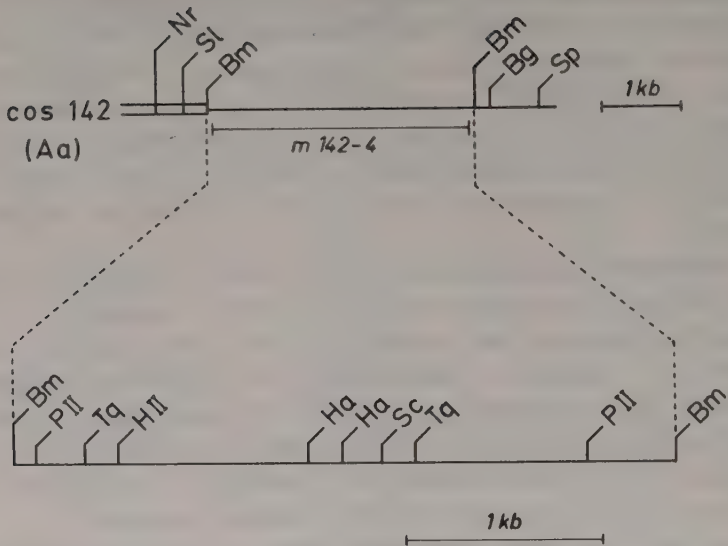


Abb. 14: Feinkartierung des 5'-terminalen Bereiches von cos 142 (Aa)

Das 5'-terminale BamHI-Fragment aus cos 142 (Aa; Abb. 13) von 3,4 kb Größe wurde in den M13 mp8 Phagenvektor subkloniert und eine Feinkartierung dieses Fragmentes erstellt. Der offene Balken von cos 142 weist auf den pHc 79-Vektoranteil hin. Das klonierte Fragment gibt bei Hybridisierung mit radioaktiv markierter Plazenta-DNA keinerlei Signale. (Die 5'-3'-Polarität des klonierten BamHI-Fragmentes mußte willkürlich gewählt werden.)

Die Bereiche der A-Regionen (cos 142 und 163), die repetitive Sequenzen tragen, wurden durch Hybridisierung mit radioaktiv markierter Plazenta-DNA identifiziert (Abb. 13).

2.4.2. Extendierung des Kernbereiches der A-Regionen

Eine Extendierung der A-Regionen in 5'- und 3'-Richtung mit Hilfe der Technik des "chromosomal walkings" erschien als vielversprechend. Aus folgenden Gründen war zu erwarten, daß entweder weitere, bisher unbekannte V_K -Gene gefunden werden könnten oder daß eine Verknüpfung von A-Regionen mit anderen bisher analysierten Regionen des V_K -Locus (33, 34, 67, 127) möglich wäre: Die A-Regionen liegen auf Chromosom 2, welches die V_K -Multigenfamilie trägt (10). Dies konnte E. Lötscher durch Hybridisierung von DNAs aus Zellhybriden mit dem zur Verfügung gestellten Klon ml63-1 (Vorl. Arbeit; Tab. 5) eindeutig nachweisen (69). Eine völlige Isolierung von V_K -Genen, wie dies durch Translozierung geschehen kann, sollte für die A-Regionen also kaum der Fall sein. Darüberhinaus wiesen die relativ kleinen V_K -Genabstände bei den A-Regionen (maximal 15 kb) darauf hin, daß auch jenseites der bisher analysierten Bereiche der A-Regionen, in unmittelbarer Nachbarschaft weitere V_K -Gene folgen könnten.

Für das "chromosomal walking" wurden spezifische Suchklone hergestellt (2.4.2.1., 2.4.2.2.). Außerdem wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei der Analyse einer Cosmidgenbank (IIIC, Ref. 55) durch Einsatz einer V_K II-Probe (aus einer Gruppe von 14 Cosmidklonen) Cosmide isoliert, welche die A-Regionen extendierten (2.4.2.1.). Zusätzlich konnten weitere Cosmide aus den terminalen Bereichen der ursprünglichen A-Region (Abb. 13) mit Hilfe von Genproben der Subgruppen II und III von H.-D. Pohlenz (55) und H.G. Bauer (64) isoliert werden.

2.4.2.1. Extendierung im 5'-terminalen Bereich mit Hilfe von Suchklonen und einer V_K -Genprobe

Zur Extendierung im 5'-terminalen Bereich waren verschiedene Versuche notwendig: Der Einsatz der Suchprobe ml42-1 hatte keine Cosmide der A-Region beim Absuchen verschiedener Cosmidgenbanken erbracht. (Vielmehr wurden Bereiche der W-Regionen mit diesem Suchklon gefunden (55), s.u.). Für die Extendierung der Aa-Region

wurde die V_K II-Genprobe m607V-3 (31) in Kombination mit der Probe m142-4 mit Erfolg verwendet. Die Durchführung dieser Versuche ist im folgenden erläutert.

Ein 800 bp großes BglII-Fragment aus dem 5'-terminalen Bereich der Region Aa (cos 142), welches frei von repetitiven Sequenzen ist, wurde als Extensionssuchklon in Betracht gezogen und in den Phagenvektor M13 mp 8 subkloniert (m142-1, Abb. 13). Die Bestimmung der genomischen Kopienzahl dieser klonierten Sequenz zeigte, daß der Klon m142-1 für einen Extensionsversuch geeignet war: Für BglII-gespaltene Plazenta-DNA wurde neben dem 0,8 kb Fragment auch ein etwa 10 kb großes, zusätzliches hybridisierendes Fragment gefunden. Im Falle der EcoRI- bzw. BamHI-Spaltung waren eine, bzw. zwei stark hybridisierende Fragmente zu finden. In allen drei Fällen, waren im entsprechenden Autoradiogramm einige (1 bis 5) vergleichsweise schwach hybridisierende Fragmente unter nichtstringenten Bedingungen nachweisbar (3 x SSC, 68°C im letzten Waschschrift). Dies wurde darauf zurückgeführt, daß der vorliegende Extensionssuchklon im Flankenbereich zweier V_K -Gene liegt. Der Klon m142-1 stammt nämlich aus dem nahen 3'-Flankenanschnitt von Gen A3, bzw. aus der fernerer 5'-Flankenregion von A4 (Abb. 13). Da die V_K -Gene nicht nur im Genbereich, sondern auch in ihren Flankenregionen Sequenzhomologie aufweisen können (66), sollte es sich bei den schwachen Hybridisierungssignalen um Kreuzhybridisierung zu A3-, bzw. A4-homologen V_K -Genflanken handeln.

Mit Hilfe des aus dem Klon m142-1 isolierten und hochligierten BglII-Fragmentes wurden die Genbanken IVa und IVb (vorl. Arbeit, 2.1.) abgesucht und sieben hybridisierende Cosmidklone (cos 225, 510-514, 662) gefunden. Keines dieser Cosmide wies jedoch das diagnostische 0,8 kb BglII-Fragment auf, sondern zeigten jeweils ein mit dem Suchklon m142-1 hybridisierendes Fragment von 6 kb Länge. Die Hybridisierung der DNAs dieser Cosmide mit Proben der V_K -Subgruppen I-IV ergab, daß cos 225 ein V_K -Gen der Subgruppe I trägt. Dieses Cosmid wurde H.-D. Pohlentz zur weiteren Bearbeitung überlassen. Es stellt einen Teil der Region Wa dar (34). Auf den anderen Cosmiden konnten keinerlei V_K -Gene nachgewiesen werden. Die zusätzliche Hybridisierung der DNAs dieser Cosmide mit dem

Subklon m142-4, welcher im 5'-terminalen Bereich der Aa-Region liegt, ergab keinerlei Hybridisierungssignale und zeigte damit zusätzlich, daß keines dieser Cosmide cos 142 extendieren kann.

Die Extendierung im 5'-terminalen Bereich mußte somit nach einer anderen Strategie vorgenommen werden. Der Subklon m141-4 trägt das 5'-terminale BamHI-Fragment (3,4 kb; Region Aa; Abb. 13 und 14). Dieser wurde als Suchklon jedoch nicht in Betracht gezogen, da die Kopienzahlbestimmung ergeben hatte, daß es sich um eine Sequenz mit niedrigem Repetitionsgrad handelte (50-100 Kopien im Humangenom). Die übrigen 5'-terminalen Fragmente von cos 142, welche als potentielle Extensionssuchklone in Frage gekommen wären, stellten aber Flankenbereiche der Gene A3 und A4 dar. Es mußte wie im Falle von m142-1 mit unerwünschten Kreuzhybridisierungen gerechnet werden.

Aufgrund dieser Gegebenheiten wurde eine "Vergleichshybridisierung" vorgenommen, d. h. es wurden zwei Proben aus dem 5'-Bereich der Aa-Region (cos 142) sukzessive für die Hybridisierung derselben Genbankfilter (IIIC; Ref. 55) eingesetzt:

- Zum einen wurde dafür die im Klon m607-3 (31) vorliegende Sequenz des Subgruppe-II- V_K -Gens, aus der Zelllinie GM 607 (31), als Hybridisierungsprobe eingesetzt (1 x SSC, 68°C im letzten Waschschritt). Ein Datenvergleich der Sequenz von Gen A3, das im Rahmen dieser Arbeit sequenziert worden war (2.5.2.1.) mit derjenigen von GM 607 hatte nämlich ergeben, daß beide V_K -Sequenzen bis auf nur einen Basenaustausch identisch sind (2.5.2.1., Abb. 25).

- Außerdem bot der Einsatz einer V_K -Genprobe den Vorteil, möglicherweise zusätzliche V_{KI} -Gene isolieren zu können, die bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht in der Arbeitsgruppe vorlagen. Um die Suche nach extendierenden Klonen jedoch so spezifisch als möglich zu machen, wurde die Genbank IIIC (55) auch mit dem Klon m141-4 hybridisiert. Damit die Zahl der mit m142-4 hybridisierenden Kolonien so klein als möglich gehalten werden konnte, wurden stringente Bedingungen (0,1 x SSC, 68°C im letzten Waschschritt) gewählt. Auf diese Art und Weise wurden mit m141-4 etwa 150 Signale erhalten. Nur diejenigen Kolonien, welche sowohl mit der V_K -Genprobe als auch mit m142-4 "doppelt-positiv" waren, konnten die

Region A extendieren. (Elf Kolonien, die bei der Hybridisierung mit dem Klon m142-4 besonders intensive Signale ergeben hatten, wurden zusätzlich isoliert.)

Im einzelnen konnten durch Einsatz der Genprobe m607-3 vierzehn Cosmidklone mit V_K II-Genen isoliert werden. Von diesen hatte cos 211 auch mit dem Klon m142-4 eine Hybridisierung ergeben und brachte für die Region Aa die gewünschte Extension (s.u.). Die anderen Cosmidklone wurden einer ersten Grobanalyse unterworfen, die zeigen sollte, ob Cosmide aus dieser Gruppe bereits etablierten V_K -Regionen (33, 34) mit V_K II-Genen zugeordnet werden könnten, bzw. welche davon bisher unbekannte V_K -Bereiche darstellten. Einerseits wurden für diese Analyse spezifische Subklone aus den bis zu diesem Zeitpunkt in der Arbeitsgruppe charakterisierten Regionen (33, 34, 56) eingesetzt. Andererseits konnten durch Einsatz von Genproben der Subgruppe I, II und III Aussagen über die V_K -Gensegmente der isolierten Cosmide erhalten werden, wodurch die Zuordnung zu bekannten Regionen erleichtert wurde. (Die verwendeten Suchklone und V_K -Proben sind in Tab. 3 angegeben.) Für diese Zwecke waren die DNAs der 14 Cosmide sowohl einer BamHI- als auch einer BglII-Einzelspaltung unterworfen worden. Die Analyse der erhaltenen Fragmentmuster (0,8%-iges Agarosegel) lieferte weitere Hinweise für die Cosmidzuordnungen. In Tabelle 4 ist das Ergebnis dieser Aufschlüsselung zusammengestellt.

Aus dieser Gruppe an 14 Cosmiden wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit drei Klone einer detaillierten Analyse unterzogen, (während die anderen Cosmide Mitarbeitern der Arbeitsgruppe zur weiteren Analyse überlassen wurden; Ref. 55, 56, 57, 65, 67, 68):

- cos 211, welches aufgrund der "Doppelhybridisierung" eine Extension einer A-Region darstellten mußte, wurde im Detail untersucht. Es wies bei der Hybridisierung mit dem Klon m142-1 (s.o.) das diagnostische 0,8 kb BglII-Fragment auf. Die Hybridisierung mit den Proben der Subgruppen I bis III hatte gezeigt, daß auf cos 211, abgesehen von den V_K -Genen A3 und A4, zwei weitere V_K -Gene (Subgruppe II) vorlagen. Diese wurden mit A1 und A2 bezeichnet (Abb. 16). Die Restriktionskarte von cos 211 ist in Abb. 15 dargestellt. Aufgrund der völligen Übereinstimmung der Restrik-

Tabelle 3: Zusammenstellung der Subklone, die für die Charakterisierung der Cosmide eingesetzt wurden, die mit Hilfe der V_K -Genprobe m607V-3 (31) isoliert worden waren

Bezeichnung des Klons	Spezifität	Zitate
m1-3	V_K I-Gensegment (Signal- sequenz, Intron, V_K -Struktur- genanteil)	66
m607V-3	V_K II-Gensegment (V_K -Struktur- genanteil)	31
m21-4	V_K III-Gensegment (Signal- sequenz, Intron)	79
mJIuL-16	V_K IV-Probe (5'-Genbereich)	75
m142-1	A-Regionen (Aa)	vorl. Arb.
m163-1	A-Regionen (Ab)	- " -
20-16	L-Regionen	78
m21-1	L-Regionen	33
m105-1	L-Regionen	74
m166-7	W-Regionen	34
m143-1	O-Regionen	34
m108-1	cos 108	69

tionskarten von cos 142 (Aa) und cos 211 über einen Bereich von 17 kb, wurde das extendierende Cosmid der Region Aa zugeordnet. Cos 211 extendierte die Region Aa um 20,5 kb. (Wie Abb. 16 und 20 zeigen, ist die Region Ab im Bereich, welcher zur Region um die Gene A3 und A4 homolog sein sollte, nicht durch Cosmide repräsentiert. Falls die Region Ab für diesen Bereich überhaupt existiert und sehr ähnlich zur Region Aa ist, wäre eine Zuordnung von cos 211 zur Region Ab ebenfalls möglich.)

Tabelle 4: Zusammenstellung der Hybridisierungsdaten, der Cosmide, die mit Hilfe der Genprobe m607V-3 isoliert worden waren

Cosmidbezeichnung	V_K -Region	V_K -Gene			Zitate
		I	II	III	
cos 211	Aa	+	+	-	v.A.
cos 212	Aa	+	+	+	65
cos 213	L	+	+	-	57
cos 214	Ob	-	+	-	v.A.
cos 215	Ob	+	-	-	34,68
cos 216 *	Ob	+	+	-	34,68
cos 217	Ob	-	+	-	34,69
cos 218	Chr 22	+	+	+	65
cos 222	Chr 22	+	+	+	63
cos 223	Chr 22	+	+	+	63
cos 224	Chr 22	+	+	+	63
cos 220	W	+	+	-	34
cos 221	W	+	+	-	34
cos 217	Chr 5	-	+	-	v.A.

Die Kennzeichnung von cos 216 mit einem Sternsymbol weist darauf hin, daß in diesem Klon der Cosmidvektor pJB 8 vorliegt. In allen übrigen Cosmiden handelt es sich um den Vektor pHc 79. Ein Kreuz in den Spalten der V_K -Genangaben gibt die Anwesenheit eines V_K -Gens an. Die Abkürzung "v.A." steht für "vorl. Arbeit".

- In dieser Arbeit wurden aus der Gruppe der isolierten 14 Cosmide cos 214 und cos 219 durch Kartierung und Hybridisierung mit verschiedenen V_K -Genproben näher untersucht (2.2.4. und 2.2.2.). Cos 214 stellt einen Teil der Region Ob dar (68). Bei der durch cos 219 repräsentierten Region (2.2.2.) handelt es sich um ein V_{KII} -Gen, welches auf Chromosom 5 transloziert ist, wie E. Löttscher zeigen konnte (69).

Es war bereits kurz erwähnt worden, daß mehrere Cosmidklone mit Hilfe des Klon m142-4, welcher eine niedrigrepetitive Sequenz trägt und aus dem 5'-terminalen Bereich der Aa-Region stammt, isoliert worden waren. Bei Hybridisierung mit dem radioaktiv markierten Klon m142-4 zeigten diese 11 Klone BamHI-Fragmente unterschiedlicher Größen. Keines dieser Cosmide wies darüberhinaus Hybridisierung mit dem Suchklon m142-1 auf, welcher in Region Aa in enger Nachbarschaft zu Klon m142-4 liegt (Abb. 13). Da weiterhin keines dieser Cosmide in seinem BamHI-, bzw. BglII-Fragmentmuster Ähnlichkeiten zu cos 211, welches die Aa-Region extendiert, zeigt, kann man mit Sicherheit sagen, daß keines von diesen Bereiche der A-Regionen repräsentiert.

2.4.2.2. Extendierung im 3'-terminalen Bereich mit Hilfe eines spezifischen Suchklons

Der 3'-terminale Bereich des Kernbereiches der A-Regionen ist durch cos 163 repräsentiert (Abb. 13 und 16). Mit Hilfe des spezifischen Suchklones m163-1 wurden extendierende Cosmide aus den Genbanken IVa und IVb (2.1.) sowohl für die Aa- als auch für die Ab-Region isoliert.

Im einzelnen wurde folgendermaßen verfahren: Um einen spezifischen Suchklon herstellen zu können, mußte zunächst der 3'-Bereich von cos 163 (Ab) feinkartiert werden. Ein 17 kb SalI-BamHI-Fragment aus dem 3'-Bereich des Cosmids wurde isoliert und mit einer Reihe von Restriktionsenzymen kartiert, wie Abb. 17 zeigt. Mit Hilfe von Proben der Subgruppe I und II wurde die Lage der V_K -Gene (A22, 23 und 24; Abb. 13 und 16) in diesem Abschnitt der Region Ab bestimmt. Bereiche mit repetitiven Sequenzen wurden durch Hybridisierung mit radioaktiv markierter Plazenta-DNA identifiziert.

Zum Zwecke der Extension wurden die Subklone m163-1 (1500 bp EcoRI-HindIII-Fragment in M13 mp10) und m163-2 (300 bp XbaI-SacI-Fragment in M13 mp10; Tab. 5; Abb. 16) konstruiert. Die Kopienzahl der in m163-1 klonierten Sequenz wurde bestimmt: Bei der Hybridisierung von gespaltenen und auf Nitrozellulose transferier-

ter Plazenta-DNA mit dem radioaktiv markierten Klon m163-1 konnte gezeigt werden, daß dieser Klon unter stringenten Bedingungen (0,5 x SSC, 68°C im letzten Waschschrift) jeweils nur eine Hybridisierungsbande zeigt (PstI: 1,7 kb; HindIII: 9,0 kb; BglII: 7,3 kb). Der Subklon m163-1 stellte somit einen sehr geeigneten Extensionssuchklon dar.

Das aus dem Klon isolierte EcoRI-HindIII-Fragment wurde zu Multimeren ligiert und in radioaktiv markierter Form für die Hybridisierung der Koloniefilter der Genbanken IVa und IVb eingesetzt. Es wurden drei Cosmide erhalten, welche sowohl die Aa- als auch die Ab-Region extendierten: cos 515, 516 und 663. Diese enthalten das diagnostische EcoRI-HindIII-Fragment von 1,5 kb Größe, wie die Hybridisierung mit m163-1 zeigte. Die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Restriktionskarten von cos 516 und cos 663 sind in Abb. 15 dargestellt. Für cos 515 war eine spezielle Kartierung nicht nötig, da die Größenbestimmung der durch die Einzelspaltungen mit Kpn I, BamHI, BglII und XbaI erzeugten Fragmente ergab, daß cos 515 völlig von cos 663 und 163 eingeschlossen wird.

Die Zuordnung dieser Extensionscosmide zu den Regionen Aa und Ab wurde folgendermaßen getroffen:

1. Zuordnung von cos 516 (Region Aa): Aa und Ab können durch diagnostische Unterschiede in ihren Restriktionskarten differenziert werden. In Abb. 18 (2.4.3.) ist die Feinkartierung eines etwa 12 kb großen BamHI-Fragmentes aus dem überlappenden Bereich von cos 142 und cos 163 dargestellt. Sowohl für die Region Aa (cos 142) als auch für die Region Ab (cos 163) wurde die Kartierung durchgeführt. Der Bereich aus Region Aa unterscheidet sich u.a. durch eine zusätzliche SacI-Spaltstelle von dem entsprechenden Bereich aus Ab. Da auch cos 516 diese spezielle SacI-Spaltstelle aufweist und repräsentiert dieser Klon somit Region Aa.

2. Zuordnung von cos 515 und 613 (Region Ab): Die Regionen Aa und Ab (cos 142 und 516, cos 163) unterscheiden sich hinsichtlich KpnI-, bzw. XhoI-Spaltstellen (Abb. 16). Diese Unterschiede erlaubten es, die Extensionscosmide 515 und 613 eindeutig Region Ab zuzurechnen.

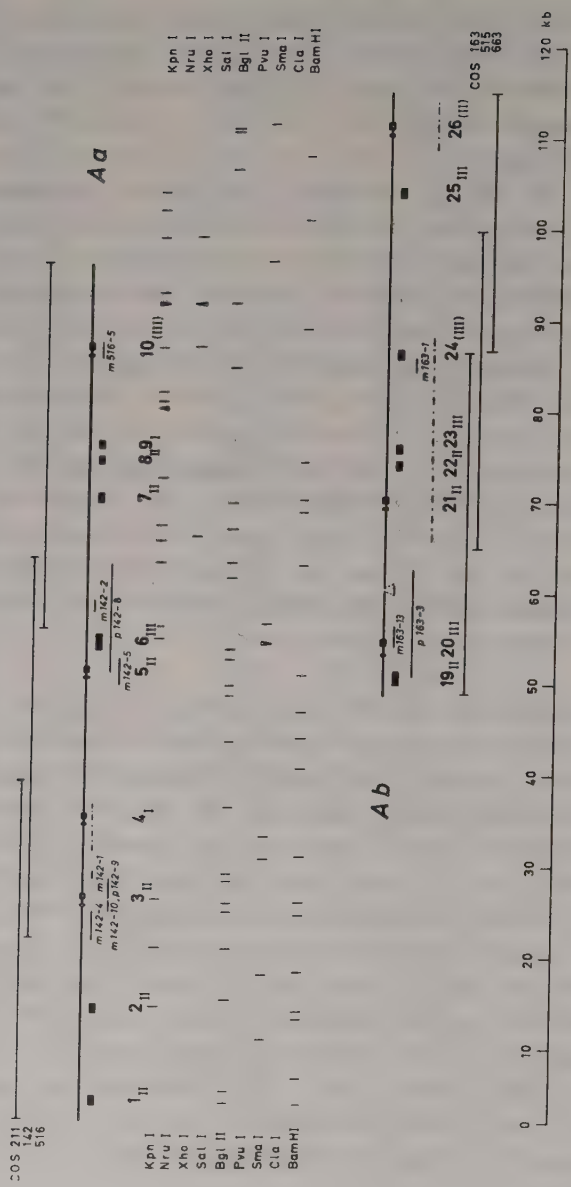


Abb. 16: Extendierung des Kernbereiches der A-Regionen (cos 142, 163) durch die Cosmide cos 211, 515, 516 und 663

Die Restriktionskarten der Cosmide, welche Teile der Regionen Aa und Ab darstellen, sind zusammenfassend angegeben (Gesamtdarstellung der A-Regionen: Abb. 20). Spaltstellen, die in beiden homologen Regionen vorliegen, bzw. nur durch eine Region repräsentiert werden können, sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Spaltstellenunterschiede sind durch Dreiecke markiert, wobei der Pfeil des Dreiecks jeweils auf diejenige Region hinweist, in welcher diese Spaltstelle gegeben ist. Die Gensegmente sind durch geschlossene Balken angegeben; bei sequenzierten Genen wurde auch der Signalpeptidanteil eingezeichnet. Die Subgruppenzugehörigkeit der Gene ist durch römische Ziffern vermerkt; die Klammern kennzeichnen Gene, bei welchen die Subgruppen-Klassifizierung nicht eindeutig möglich war. Zusätzliche Erläuterungen zu den Genen der A-Regionen findet man in Tab. 2. Subklone sind mit durchgehenden Linien angegeben. Strichpunktierte Bereiche weisen darauf hin, daß diese Abschnitte feinkartiert vorliegen (2.4. und 2.5.). Um maximale Homologie zu erhalten, wurde ein 0,7 kb-Stück der Region Ab gesondert gezeichnet.

Für die Region Aa wurde eine Extension von 32,5 kb, für die Region Ab von 28,0 kb erreicht.

Durch Einsatz von V_K -Proben der Subgruppen I, II und III wurden die durch Extension gewonnenen 3'-Bereiche nach weiteren V_K -Gensegmenten abgesucht. Es wurden sechs weitere V_K -Gene gefunden: Für die Region Aa (cos 516) wurden die Gene A7, 8, 9 und A10, für die Region Ab (cos 663) die Gene A25 und 26 im extendierten Bereich identifiziert. Deren genaue Lage und Subgruppenzugehörigkeit ist in Abb. 16 angegeben.

Der Kernbereich der A-Regionen (cos 142 und 163, Abb. 13), welcher ursprünglich 10 V_K -Gene repräsentiert hatte (Abb. 13), konnte im Rahmen dieser Arbeit durch "chromosomal walking" in beide Richtungen um insgesamt 81 kb und acht weitere V_K -Gene erweitert werden. (Durch neuere Untersuchungen der A-Regionen - im wesentlichen durch W. Lorenz (67) - kennt man inzwischen 28 V_K -Gene der A-Regionen in einem Bereich von etwa 250 kb; Abb. 20)

Bereits die Analyse des Kernbereiches der A-Regionen (cos 142 und cos 163) hatte gezeigt, daß innerhalb desjenigen Bereiches, in dem die beiden Cosmide Überlappung zeigten, Unterschiede bestanden (Spaltstellenunterschiede zwischen cos 163 und 142, Abb. 13 und 18). Einerseits bestand die Möglichkeit, daß es sich lediglich um allelische Varianten einer Region handelte. Da jedoch bereits für Regionen der V_K -Genfamilie Duplikationen nachgewiesen worden waren (33, 34), konnte man auch im Falle der A-Region eine Duplikation großer Genombereiche vermuten.

Um diese, im Hinblick auf die Evolution und Struktur der V_K -Genfamilie interessante Fragen zu klären, kann man folgendermaßen vorgehen: Man untersucht DNAs verschiedener, nicht miteinander verwandter Individuen speziell in Hinsicht auf einen Spaltstellenunterschied. Zu diesem Zweck spaltet man die DNAs mit denjenigen Enzymen, welche aufgrund der Spaltstellendifferenzen für beide Situationen (z.B. Aa und Ab) Fragmente unterschiedlicher Größe erzeugen. Mit Hilfe eines sehr spezifischen Subklones (aus dem unmittelbar benachbarten Bereich des Spaltstellenunterschiedes) hybridisiert man anschließend die auf Nitrozellulose transferierten DNAs. Handelt es sich um einen allelischen Polymorphismus, so findet man, daß manche Individuen nur eines von beiden, andere beide Allele besitzen. Es ist jedoch nicht der Fall, daß alle Individuen beide Fragmente aufweisen. Dies ist nämlich nur dann der Fall, wenn es sich um zwei verschiedene Genloci handelt. (Diese können natürlich ihrerseits wiederum in unterschiedlichen Varianten vorliegen.) Zwei sehr homologe und große Genombereiche können aber nicht zufällig mit sehr ausgeprägter, struktureller Ähnlichkeit entstanden sein, sondern müssen durch Duplikation auseinander hervorgegangen sein.

Im Falle der A-Regionen wurden, um diese Fragestellung untersuchen zu können, zunächst Feinkartierungen der überlappenden Bereiche aus cos 142 und 163 durchgeführt. Das 12,0 kb große BamHI-Fragment aus cos 142 und das 12,7 kb große BamHI-Fragment aus cos 163 (Abb. 13) wurden in den Vektor pBR 322 subkloniert (p142-8 und p163-3; s. Tab. 5). Die Feinkartierungen beider, subklonierter Bereiche sind in Abb. 18 dargestellt. Abgesehen von dem be-

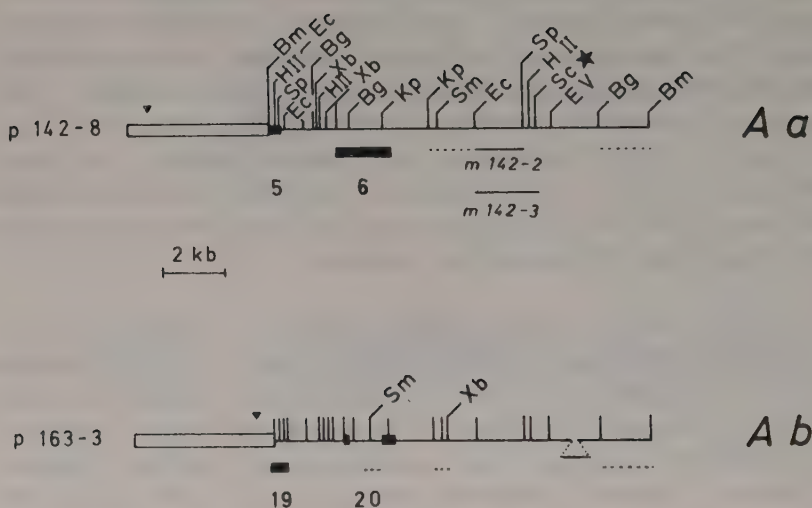


Abb. 18: Feinkartierungen zweier homologer Abschnitte aus dem Kernbereich der A-Regionen; Konstruktion eines spezifischen Subklons für den Nachweis der Duplikation der A-Regionen

Dargestellt sind die Feinkartierungen derjenigen Anteile der A-Regionen (Kernbereich), die aus dem überlappenden Bereich von cos 142 (Aa) und cos 163 (Ab) stammen (s. Abb. 13). Die Subgruppenklassifizierung der V_K -Gene, die mit Nummern gekennzeichnet sind, ist in Tab. 2 angegeben. Die Sequenzbereiche der V_K -Gene sind durch ausgefüllte Balken markiert. Nur diejenigen Spaltstellen in Region Ab, die nicht in Region Aa vorliegen, sind explizit eingezeichnet. Die anderen Spaltstellen, die mit denjenigen aus Aa übereinstimmen, sind durch vertikale Linien markiert. Die $SacI$ -Spaltstelle, die nur in Aa vorliegt, ist mit einem Stern hervorgehoben. Die spezifischen Subklone m142-2 und m142-3, die für den Nachweis der Duplikation der A-Regionen konstruiert wurden, sind durch dünne Linien dargestellt. Um eine Homologie der Restriktionskarten zu erhalten, wurde ein 700 bp Anteil aus Ab gesondert herausgezeichnet (maßstabsgetreue Aussparung). Repetitive Sequenzbereiche sind durch punktierte, waagrechte Linien gekennzeichnet. Mit einem Dreieck ist auf die $EcoRI$ -Spaltstelle im Vektor pBR 322 hingewiesen.

Tabelle 5: Subklone aus dem Kernbereich der A-Regionen

Cosmid	Subklon	Restriktionsenden des Fragmentes 5' 3'		Fragmentgröße (kb)	Vektor/ Spaltung
cos 142 (Aa)	m142-1	BglII	BglII	0,8	mp8 (BamHI)
142	m142-2	EcoRI	SphI	1,4	mp18(EcoRI, SphI)
142	m142-3	EcoRI	SacI	1,8	mp10(EcoRI, SacI)
142	m142-4	BamHI	BamHI	3,4	mp8 (BamHI)
142	m142-5	BglII	BglII	2,9	mp10(BamHI)
142	p142-6	BamHI	BglII	2,0	pBR 322 (BamHI)
142	p142-7	SphI	SphI	5,0	pBR 322 (SphI)
142	p142-8	BamHI	BamHI	12,0	pBR 322 (BamHI)
cos 163 (Ab)	m163-1	EcoRI	HindIII	1,5	mp10(EcoRI, HindIII)
163	m163-2	XbaI	SacI	0,3	mp10(XbaI, SacI)
163	p163-3	BamHI	BamHI	12,7	pBR 322 (BamHI)
cos 516 (Aa)	p516-1	EcoRI	EcoRI	5,7	pBR322(EcoRI)
516	p516-2	EcoRI	EcoRI	3,7	- " -
516	p516-3	EcoRI	EcoRI	11,6	- " -
516	p516-4	EcoRI	EcoRI	11,5	- " -

Die Positionen dieser Subklone im Kernbereich der A-Regionen sind in den Abbildungen 13, 15, 16 17 und 20 angegeben.

reits bekannten Unterschied (eine zusätzliche SmaI-Spaltstelle in cos 163) wurden weitere Differenzen gefunden, nämlich eine SacI-Stelle, welche nur im Bereich aus p142-8 (cos 142) vorliegt, und eine XbaI-Stelle, die nur im Bereich von p163-3 (cos 163) vorliegt (Abb. 18). Außerdem findet man im analysierten Bereich

einen Längenpolymorphismus: wie in Abb. 18 dargestellt, entspricht dem 1,5 kb EcoRV-BglII-Fragment aus cos 142 ein größeres von 2,2 kb Länge aus cos 163.

Um einen spezifischen Subklon für die Untersuchung der Frage der Duplikation herstellen zu können, war es zunächst nötig, mit Hybridisierungsproben der Subgruppen II und III die Lage der V_K -Gensegmente genau festzulegen. Außerdem wurden mit markierter Plazenta-DNA Bereiche mit repetitiven Sequenzen identifiziert. Es wurden schließlich zwei geeignete Fragmente aus p142-8, nämlich das 1,3 kb EcoRI-SphI- und das 1,7 kb EcoRI-SacI-Fragment in M13-Vektoren subkloniert (m142-2 und 142-3; Tab. 5). Damit sollte in BglII-SacI-Spaltungen differenzierend das 5,8 kb große Fragment (Aa), bzw. das 8,5 kb große BglII-Fragment (Ab) nachzuweisen sein. Die Kopienzahl der in m142-2 klonierten Sequenz wurde bestimmt. Der Klon stellte sich als sehr spezifisch heraus: in EcoRI-EcoRV-gespaltener Plazenta-DNA wurde nur ein hybridisierendes Fragment von 2,3 kb Länge gefunden. Für die EcoRI-BglII-Spaltung wurden 3,7 und 4,4 kb große und für die EcoRI-BamHI-Spaltung 5,4 und 6,1 kb große, hybridisierende Fragmente nachgewiesen, wobei das Bandenduplett jeweils auf den erwähnten Längenpolymorphismus, bzw. die Duplikation zurückzuführen ist.

DNAs von elf verschiedenen Individuen wurde einer BglII-SacI-Doppelspaltung unterworfen. Diese DNAs waren von M. Pech aus dem peripheren Blut verschiedener Spender und aus Zelllinien präpariert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden. Nach elektrophoretischer Größenauftrennung, dem Transfer der Spaltprodukte auf Nitrozellulose und anschließender Hybridisierung mit dem diagnostischen Klon m142-2 wurde in allen Fällen ein Bandenduplett (5,8 und 8,5 kb) erhalten, wie Abb. 19 zeigt. Da alle Individuen die Fragmente aus cos 142 und 163 aufweisen, kann man mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, daß die A-Regionen durch Duplikation auseinander hervorgegangen sind und cos 142 und 163 keine allelischen Varianten nur eines V_K -Genlocus darstellen.

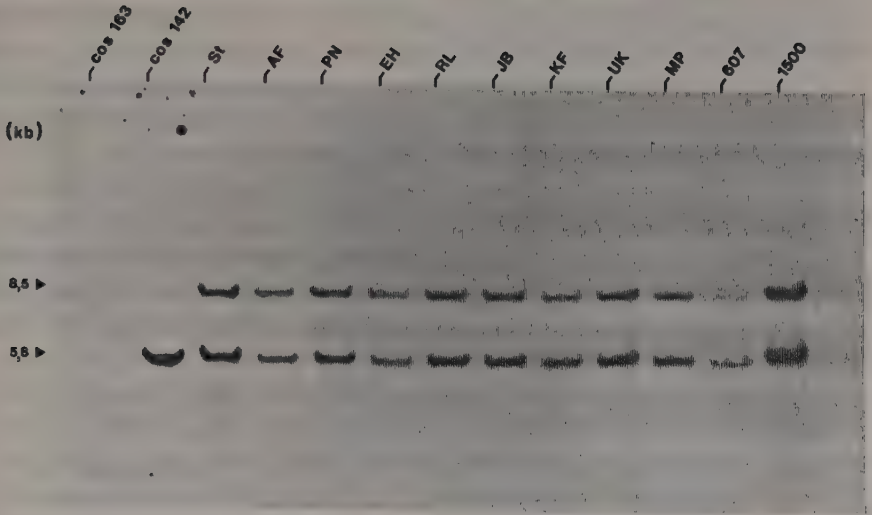


Abb. 19: Nachweis der Duplikation der A-Regionen

Dargestellt ist das Autoradiogramm der Hybridisierung von BglII-SacI-gespaltener DNA von elf verschiedenen Individuen mit dem diagnostischen Subklon m142-2.

Je 15 µg an DNA von elf verschiedenen Individuen (Ref. 33) waren nach Doppelspaltung mit BglII und SacI auf einem 6 mm dicken, 0,7%-igen Agarosegel (Na-Acetat-Puffer) aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulose ("Gene Screen", NEN) transferiert worden. Die Hybridisierung erfolgte mit dem Subklon m142-2 (hochligiertes Fragment) unter stringenten Bedingungen (0,5 x SSC, 68°C im letzten Waschschriff). Für die Autoradiographie wurde zur Signalverstärkung eine CAWO SE6-Folie bei -78°C eingesetzt.

Als Größenreferenz waren je 10 ng an BglII-SacI-gespaltener DNA der als Referenz dienenden Cosmidklone cos 142 und 163 eingesetzt worden. Um vergleichbare Wanderungsgeschwindigkeiten der DNAs bei der Elektrophorese zu erreichen, waren der gespaltenen Cosmid-DNA je 15 µg an Ultraschall-behandelter Lachsspermien-DNA zugesetzt worden. Die Größen der hybridisierenden Fragmente sind am Bildrand in kb angegeben.

Folgende DNAs waren verwendet worden:

Plazenta-DNAs (St, AF), DNA einer Myelomzelllinie (GM 1500), DNA aus einer lymphoblastoiden Zelllinie (GM 607) und DNAs aus peripherem Blut (PN, EH, RL, JB, KF, UK, MP)

Der Beweis der Duplikation wurde für den Kernbereich der A-Regionen durchgeführt. Die im Laufe der Extension gewonnenen Cosmide konnten ausgehend vom Kernbereich jeweils eindeutig aufgrund von Spaltstellenunterschieden einer von beiden Regionen zugeordnet werden (Abb. 20). Cosmide, die keiner von beiden Regionen zuzuordnen gewesen wären, wurden nicht gefunden.

Neben den L- und W-Regionen (33, 34) stellen die A-Regionen das dritte Beispiel von V_K -Regionen dar, für die eine Duplikation gezeigt werden konnte. Für einen weiteren Bereich der V_K -Genfamilie, die O-Region (34, 68), gibt es ebenfalls Hinweise für eine Duplikation großer Genombereiche.

2.4.4. Bestimmung der 5'-3'-Polarität der V_K -Gensegmente im Bereich der A-Regionen

Im Laufe der Reifung von B-Lymphozyten kommt es zur Kombination verschiedener Immungensegmente zu vollständigen Immunglobulinen, welche für Proteine der leichten oder schweren Ketten codieren (6, 7, 8). Es gibt mehrere Modelle, welche diesen Umlagerungsmechanismus beschreiben (7, 8, 70, 71, 72). In allen Fällen spielt dabei die 5'-3'-Polarität der Gensegmente, insbesondere der V-Segmente eine wichtige Rolle. Aufgrund der Tatsache, daß die A-Regionen einen wesentlichen Anteil der V_K -Genfamilie darstellen (bisher 28 Gensegmente) und demzufolge diese Gensegmente mit hoher Wahrscheinlichkeit an Umlagerungen beteiligt sein sollten, wurde die Orientierung der V_K -Segmente der A-Regionen bestimmt.

Bei dieser Strukturanalyse im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Ausnahme der beiden 3'-terminalen Gene A14 (Aa) und A28 (Ab) alle V_K -Gene der A-Regionen berücksichtigt. Da beide A-Regionen strukturell sehr ähnlich sind (Abb. 13, 16, 20), wurde bei den jeweiligen Paaren an homologen V_K -Genen nur für jeweils ein Gensegment die Orientierung ermittelt und die erhaltene Polarität für das zweite, homologe V_K -Gen übernommen.

Die 5'-3'-Richtung der V_K -Gene der A-Regionen wurde folgendermaßen bestimmt:

1. Festlegung der Polarität durch Hybridisierung

Zunächst erfolgte eine (Fein-)Kartierung der Genregionen. Spezifische Teilsequenzen der V_K -Gene dienten sodann als Hybridisierungsproben. Bei diesen Proben handelte es sich um 5'- und 3'-Anteile von V_K -Genen, welche entsprechend der Subgruppenzugehörigkeit des zu untersuchenden V_K -Gens passend ausgewählt wurden. Eine Übersicht der eingesetzten Proben ist in Tab. 6 zusammengestellt. In einigen, günstigen Fällen (A1, 2, 13) war bereits die übliche Cosmidkartierung ausreichend, um durch Hybridisierung mit spezifischen Subklonen die Genorientierung festzulegen. (Mindestens eines der bei der Cosmidkartierung eingesetzten Enzyme zerlegte den V_K -Genbereich in geeigneter Weise.) Für die Gene A4, 5, 21, 22 und 23 war dagegen eine Feinkartierung nötig. Die nach Subklonierung, bzw. Fragmentisolierung erstellten Feinkartierungen sind in Abb. 21 dargestellt. Mindestens eine Restriktionsspaltstelle, die das jeweilige V_K -Gensegment (möglichst symmetrisch) spaltet, mußte vorliegen.

2. Bestimmung der Orientierung durch Sequenzierung

Für eine Reihe von Genen der A-Regionen konnte die Orientierung der V_K -Gensegmente durch Sequenzierung der Genbereiche bestimmt werden. Die Gene A3, 4, 10, 20 und 26 wurden im Rahmen dieser Arbeit sequenziert. Die Sequenzen der Gene A5 und A7 erstellte E. Huber (57), diejenige des Gens A25 E. Lötscher (69).

Eine tabellarische Zusammenstellung, von welchen V_K -Genen der A-Regionen die Polarität direkt (Sequenzierung, Hybridisierung), bzw. indirekt (Homologievergleich der A-Regionen) ermittelt wurde, ist in Tab. 6 angegeben.

Die Bestimmung der Polarität der V_K -Gene aus den A-Regionen ergab, daß alle untersuchten Gensegmente die gleiche 5'-3'-Orientierung aufweisen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für andere Regionen der V_K -Genfamilie, nämlich die L- und O-Regionen (32,

Abb. 20: Gesamtdarstellung der durch Duplikation auseinander hervorgegangenen A-Regionen Aa und Ab

Die Restriktionskarten der Cosmidklone, welche die bisher analysierten Bereiche der A-Regionen bilden, sind zusammenfassend dargestellt. Die Karten der Cosmide 142, 211, 163, 515, 516 und 663 wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt (Abb. 16). Die Cosmidklone 237, 656 und 659 wurden von W. Lorenz (67), cos 130, 131, 139 und 212 von F.-J. Zimmer (65) und cos 109 von H. Smola (84) kartiert. Spaltstellen, die für beide Regionen zutreffen, sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet; solche, die nur in einer von beiden Regionen vorliegen, sind mit Pfeilen markiert. Der Pfeil weist dabei jeweils auf diejenige Region hin, in welcher die Spaltstelle vorliegt. Die mit Zahlen versehenen V_K -Gene (Subgruppenklassifizierung durch römische Ziffern) sind durch ausgefüllte Balken gekennzeichnet; bei sequenzierten Genen ist der Signalpeptidanteil jeweils gesondert dargestellt (weitere Erläuterungen zu den Genen: Tab. 2). Strichpunktierte Bereiche sind feinkartiert (2.4. und 2.5.). Der Pfeil in Ab weist auf ein 0,7 kb-Stück hin, welches zusätzlich nur in Region Ab vorliegt. Cos 237 (Ab') stellt wahrscheinlich einen Teil von Region Ab dar und verknüpft Ab mit einer der O-Regionen (34, 68), sodaß die 5'-terminalen Gene von cos 237 mit 09 und 010 (34) identisch sein dürften.

33, 34, 57, 68), die B-Region (67, 75) und Teile der W-Regionen (34, 65) gefunden. Lediglich für einen Teilbereich einer W-Region wurden V_K -Gene nachgewiesen, die zu den übrigen V_K -Genen der Region inverse Orientierung aufweisen.

Von den gängigen Modellen zur Beschreibung der V-Genumlagerungen beschreibt das "Inversions-Deletions-Modell" (70, 71) die Umlagerung der Gensegmente am besten: Alle V-Gensegmente einer bestimmten Orientierung werden danach durch Inversion, alle mit der gegensinnigen Polarität durch Deletion umgelagert. (Sekundärumlagerungen können folgen.) Da alle V_K -Gene der A-Regionen dieselbe Orientierung aufweisen, sollten sie (zunächst) entweder nur durch Deletion oder nur durch Inversion aktiviert werden. Von Pech et al. wurde die Hypothese aufgestellt, wonach der gesamte V_K -Locus in duplizierter Form vorliegt und die beiden Teile der Duplikation inverse Anordnung zueinander aufweisen (33). Für die eine

Tabelle 6: Bestimmung der 5'-3'-Polarität von V_K -Genen der A-Regionen; Zusammenstellung der für die entsprechenden Hybridisierungen eingesetzten Subklone

Gen- bezeichnung (Aa) (Ab)	Sub- gruppe	Methode zur Festlegung der Polarität	5'-Probe	3'-Probe
A1 (A15)	II	H	m6410-L(80)	m607V-3(31)
A2 (A16)	II	H	m6410-L(80)	m607V-3(31)
A3	II	S (v.A.)	-	-
A4	I	H, S (v.A.)	m1L-4 (*)	m1-3 (66)
A5 (A19)	II	H; S (57)	m142-10(v.A.)	m607V-3(31)
(A6) A20	III	S (v.A.)	-	-
(A7) A21	II	H; S (57)	m6410-L(80)	m607V-3(31)
A8 (A22)	II	H	m6410-L(80)	m607V-3(31)
A9 (A23)	I	H	m1L-4 (*)	m1-3 (66)
A10 (A24)	I/III (?)	S (v.A.)	-	-
A11 (A25)	III	S (69)	-	-
(A12) A26	II (?)	S (v.A.)	-	-
A13 (A27)	II	H	m6410-L(80)	m607V-3(31)

Aufgrund der ausgeprägten Homologie der beiden A-Regionen war es ausreichend, nur für einen Vertreter eines Genpaares die Orientierung festzulegen. Die Gennummer desjenigen V_K -Genes, für das die Bestimmung nicht vorgenommen wurde, ist eingeklammert. Das Symbol "H" weist auf Hybridisierung, das Symbol "S" auf Sequenzierung hin - also die jeweils eingesetzte Methode zur Ermittlung der Polarität. Der unveröffentlichte Subklon m1L-4 ist mit einem Stern markiert. Dieser Klon stellt einen Bereich des V_{KI} -Subklons m1-3 (66) dar, erkennt die 5'-Signalpeptidsequenz von V_{KI} -Genen und wurde von H.G. Klobeck konstruiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Das bei der Subgruppenklassifizierung in einigen Fällen beigefügte Fragezeichen weist darauf hin, daß diese V_K -Gene keiner der vier V_K -Subgruppen eindeutig zugeordnet werden können (s. 2.5.2.3.). Die Abkürzung "v.A." steht für "vorl. Arbeit".

Fällen handelt es sich um isolierte und feinkartierte Fragmente aus den Cosmidklonen cos 142 und 163. Im 5'-Bereich des Gens A8 sind zwei AccI-Spaltstellen mit dem Kleinbuchstaben b versehen. Damit soll darauf hingewiesen werden, daß nur eine von beiden Restriktionsspaltstellen zutrifft. Die Positionen der V_K -Gene sind durch geschlossene Balken markiert. Diejenigen Teilbereiche, die Hybridisierung mit V_K -5'-Proben (L) und V_K -3'-Proben (V) ergaben, sind durch Linien aus alternierenden Punkten und Strichen gekennzeichnet. Die jeweils eingesetzten Hybridisierungsproben sind in Tab. 6 aufgeführt. Der letzte Waschschrift erfolgte bei diesen Hybridisierungen bei 1 x SSC und 68°C.

Gruppe an V_K -Genen würde (bei Primärumlagerungen) Deletion, für die andere Inversion gelten. Die Regionen Aa und Ab könnten Teile dieser beiden inversen Strukturen darstellen.

2.5. Sequenzanalysen und Subgruppenzuordnung ausgewählter V_K -Gene der A-Regionen

Die V_K -Familie des Menschen kann im wesentlichen in vier Subgruppen, bestehend aus unterschiedlich vielen Mitgliedern, eingeteilt werden. Dies hatten die Analysen von Proteinsequenzen vieler Immunglobuline, die aus Myelomen isoliert worden waren, ergeben (21, 22). Die Grundlage dieser Klassifizierung bildete der Vergleich der Proteinsequenzen, insbesondere unter dem Gesichtspunkt, welche Aminosäurepositionen der Immunglobuline jeweils invariant und damit für bestimmte Unter- oder Subgruppen charakteristisch sind. Aufgrund dieser Protein-chemischen Untersuchungen teilte man die Gruppe der V_K -Proteine in vier Subgruppen ein. Vor kurzem fand Stavnezer (24) ein V_K -Gen, das für ein Protein codiert, welches keiner der bisher bekannten Subgruppen eindeutig zugeordnet werden konnte und möglicherweise einen Vertreter einer weiteren, fünften V_K -Subgruppe darstellt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden V_K -Gene auch unter dem Kriterium der Subgruppenklassifizierung untersucht. Meist war eine Zuordnung zu einer der vier Subgruppen problemlos durch Hybridisierung mit Hilfe von Proben der Subgruppen I - IV (4.1.4.) möglich. Abgesehen von einigen Ausnahmen ergab jeweils dasjenige Fragment eines Cosmidklons, welches ein V_K -Gen trägt, nur mit einer der Subgruppenproben ein deutliches Signal. Einige wenige V_K -Gensegmente zeigten jedoch mit verschiedenen Proben Hybridisierungssignale. In diesen Fällen wurde eine vergleichende Hybridisierung unter stringenten Bedingungen (2.5.1.) oder eine Sequenzierung durchgeführt.

2.5.1. Subgruppenzuordnung durch vergleichende Hybridisierung

Für das V_K -Gen A10 (A24) (Abb. 20) war eine Subgruppenklassifizierung durch Hybridisierung zunächst nicht möglich. Das entsprechende V_K -Gensegment ergibt zwar unter mäßig stringenten Bedingungen (1 x SSC, 68°C im letzten Waschschrift) mit der Probe der Subgruppe I, ml-3 (66), ein Signal. Dieses ist jedoch bedeutend

schwächer als man es für ein typisches V_K -Gen dieser Subgruppe erwarten würde. Weiterhin wurde unter denselben Bedingungen für das gleiche Gen auch mit einer Probe der Subgruppe III, m21-4 (79), ein schwaches Signal erhalten.

Eine vergleichende Hybridisierung unter stringenten Bedingungen sollte klären, welcher Subgruppe dieses V_K -Gen zuzuordnen wäre. Zu diesem Zweck wurden etwa äquimolare Mengen des Fragmentes von cos 516 (Region Aa), welches Gen A10 trägt (1,0 kb HpaI-Fragment), und von DNA-Fragmenten, die je einen Vertreter der Subgruppe I (m1-3) und III (m41V-7) darstellen, auf Nitrozellulose transferiert. Von dem in doppelter Ausfertigung angefertigten Filter wurde der eine mit einer Probe der Subgruppe I (m1-3; Ref. 66), der andere mit einer Subgruppe III-Probe (m41V-7; Ref. 79) stringent hybridisiert (0,1 x SSC, 68°C im letzten Waschschrift).

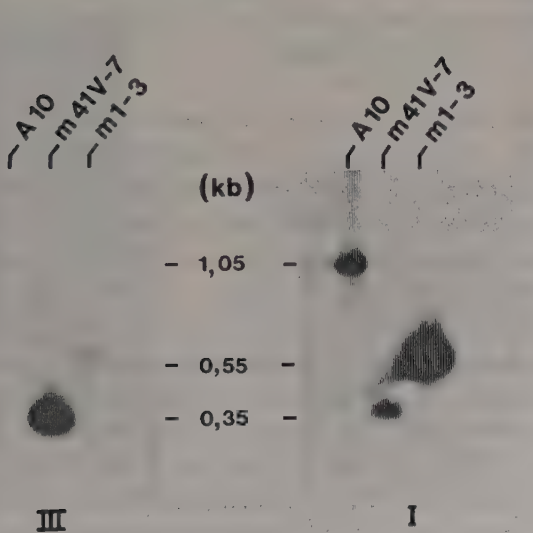
Wie das in Abb. 22 dargestellte Autoradiogramm zeigt, weist A10 mit der Probe der Subgruppe I ein schwaches Signal auf, mit der Subgruppen I-Probe jedoch nicht. Deswegen könnte man Gen A10 der Subgruppe I zuordnen. Die daraufhin durchgeführte Sequenzanalyse (2.5.2.3.) ergab, daß A10 (A26) zwar Homologie zu beiden V_K -Subgruppen (I, III) aufweist, keiner von beiden jedoch eindeutig zuzurechnen ist. Man kann annehmen, daß es sich bei diesem V_K -Gen um den ersten Vertreter einer neuen Subgruppe handelt.

2.5.2. Sequenzanalysen fünf ausgewählter V_K -Gene der A-Regionen

Sequenzanalysen von V_K -Genen der A-Regionen waren aufgrund folgender Fragestellungen vorgenommen worden:

- Für die Gene A4, A10 (A24) und A26 (A12) war die Frage der Subgruppenklassifizierung und der Genorientierung zu klären.

Abb. 22: Vergleichshybridisierung zum Zwecke der Subgruppenzuordnung von Gen A10



Dargestellt ist das Autoradiogramm zweier Filter mit verschiedenen Subgruppenproben (I, III). Das Autoradiogramm auf der linken Seite zeigt die Hybridisierung mit der Subgruppe III-Probe m41V-7 (79), dasjenige auf der rechten Seite die Hybridisierung mit der Subgruppe I-Probe m1-3 (66). In den mit A10 gekennzeichneten Spuren liegt ein 1,05 kb großes HpaI-Fragment vor

(aus cos 516, Region Aa, s. Abb. 15 und 16), welches den gesamten V_K -Genbereich von A10 repräsentiert (2.5.2.3.). In den mit m41V-7 markierten Spuren handelt es sich um ein 350 bp EcoRI-HindIII-Fragment (V_K III-Region; Ref. 79), in den mit m1-3 bezeichneten Bahnen um ein 550 bp PstI-Fragment einer V_K I-Genregion (aus Klon m1-3; Ref. 66). Diese DNA-Fragmente liegen in etwa äquimolaren Mengen vor.

Der abschließende Waschschrift war bei 0,1 x SSC und 68°C durchgeführt worden. Die Größen der hybridisierenden Fragmente sind zwischen den Autoradiogrammen in kb angegeben.

- Bei Gen A 20 (A6) lag eine ungewöhnliche V_K -Genstruktur vor: es wurde ein, für ein V_K -Gen, ungewöhnlich großes Intron von 1,4 kb Länge identifiziert. Die Sequenzanalyse zeigte, daß es sich dabei um eine Insertion eines transposablen, repetitiven Elements in den V_K -Intronbereich handelte.

- Zum Zwecke der 3'-Extension des Kernbereichs der A-Region Aa war die Sequenzanalyse des Gens A3 hilfreich.

- Schließlich diente die Sequenzierung eines sehr schwach mit einer Probe der Subgruppe III hybridisierenden Fragmentes aus cos 142 (Aa) zur Untersuchung der Frage, ob in diesem Fall ein sehr Sequenz-divergentes V_K -Gen vorliegt.

Die Sequenzierungen wurden nach der "Dideoxykettenabbruch-Methode" nach Sanger (82) durchgeführt. Ein diesbezügliches Beispiel ist in Abb. 23a dargestellt. Um in Ausnahmefällen Sequenzierungsklone bis in einen Bereich von etwa 500 bp auswerten zu können, wurden 100 cm lange Sequenzierungsgele (83, 84) eingesetzt. Ein Beispiel hierfür ist in Abb. 23b zu sehen.

Ein V_K -Gen des Menschen setzt sich zusammen aus dem Bereich für die Signalpeptidsequenz, dem Intron und dem Abschnitt für den Strukturgenanteil. Darüberhinaus sind dem V_K -Genbereich Promotorsequenzen im nahen 5'-Bereich (pd-, dc-, TATA-Box), die etwa innerhalb eines Bereiches von 150 bp stromaufwärts des Gens liegen, zuzurechnen. Signalsequenzen (Hepta- und Nona-Nukleotidsequenzen) im nahen 3'-Bereich des Gens (30 bp) vervollständigen ein potentiell funktionelles V_K -Gensegment. Bei den vorliegenden Sequenzanalysen wurden die V_K -Gene innerhalb dieses Bereiches untersucht. Meist wurden noch weitere Bereiche der 5'- und 3'-Flanken in die Sequenzierung miteinbezogen. Nur im Falle des Gens A26 wurde auf die Analyse des Bereichs für das Signalpeptid verzichtet.

Um Sequenzierungsfehler auf ein Minimum zu reduzieren, wurden die V_K -Gene zumindest im Bereich des Strukturgenanteils durch Strang- und Gegenstrang-Sequenzierung untersucht. Die Sequenzierungsklone sind so konstruiert, daß eine rasterartige Überlappung gegeben war. Damit konnte die Artefaktmöglichkeit, daß kleine Fragmente bei der Sequenzierung übersehen würden, ausgeschlossen werden.

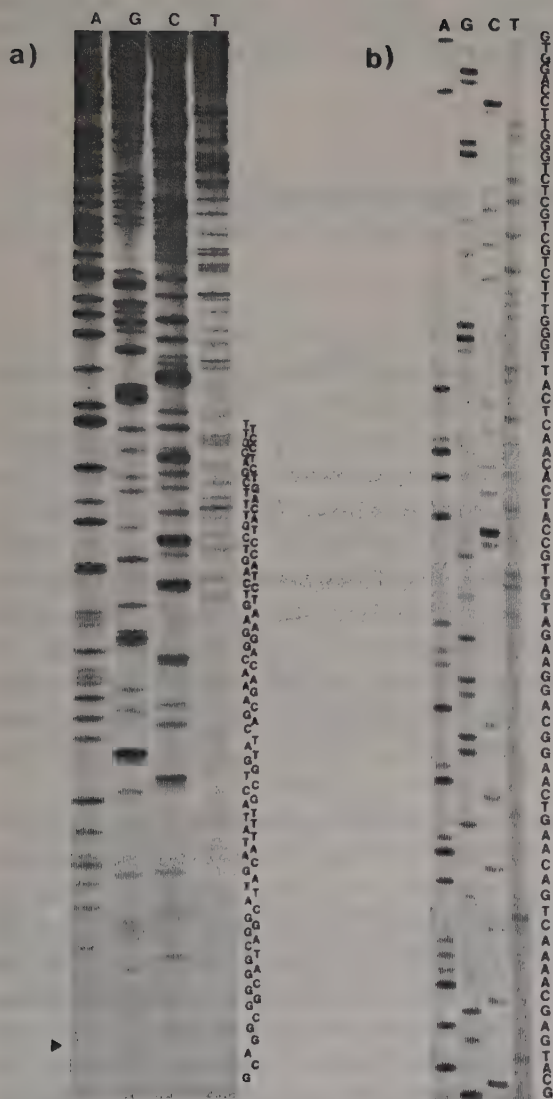


Abb. 23: Autoradiogramme von Sequenzierungsgelen

a) Dargestellt ist das Autoradiogramm der Sequenzierung des Klons m142-25 aus Gen A4 (Abb. 24; Tab. 7). Von diesem Klon, der ein 480 bp HpaII-XbaI-Fragment im Vektor M13 mp10 trägt, sind etwa 90 Nukleotide - mit den Großbuchstaben A, G, C und T bezeichnet - aus dem V_H-Genbereich (CDR1, FR2, CDR2) angegeben. Die entsprechende Region ist in Abb. 26 (A4) im Bereich von Position 71 - 159 (Nukleotidnumerierung) zu finden. Auf die Stelle, an welcher der M13-Vektor in das klonierte Fragment übergeht, ist in der Abbildung mit einem Dreieck hingewiesen. Die radioaktiv (³²P- α -ATP) markierten Polynukleotide, welche nach der Dideoxykettenabbruch-Methode erzeugt worden waren, sind auf einem 6%-igen Acrylamidgel aufgetrennt worden. Der Bromphenolfarbstoff war bei dieser Elektrophorese bis zum unteren Rand des Gels gewandert.

b) Ein Ausschnitt eines 100 cm langen Sequenzgels ist in dieser Autoradio-

graphie abgebildet. Es handelt sich um einen Anteil des Gens A10 (Abb. 28), der von dem Klon m516-6 (800 bp PstI-HpaI-Fragment in M13 mp10; Abb. 27, Tab. 7) dargestellt wird. Die Nukleotidposi-

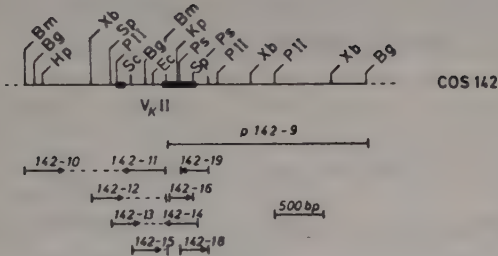
tionen von -300 bis -219 aus dem 5'-Genbereich sind am Bildrand angegeben (Abb. 28). Um Polynukleotide noch im Größenbereich bis 500 bp auftrennen zu können, waren die radioaktiv markierten (^{32}P - α -ATP) Einzelstrangfragmente auf 1 m langen, temperierten (55°C), 6%-igen Acrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt worden.

2.5.2.1. Das V_K -Gen A3 stellt das Keimbahnäquivalent zu dem in der lymphoblastoiden Zelllinie GM 607 exprimierten V_K -Gen dar

Von Gen A3, welches in der Region Aa liegt (cos 142; Abb. 13, 16, 20) war aufgrund der ausschließlichen Hybridisierung des entsprechenden Fragmentes aus cos 142 mit der Probe m607V-3 (31) bereits bekannt (2.4.), daß es sich dabei um ein V_K -Gen der Subgruppe II handelte. Da bis zu diesem Zeitpunkt kaum Sequenzen dieser Subgruppe veröffentlicht waren, wurde dieses Gen samt Flankenbereichen (insbesondere im 5'-Bereich) nach der, aus Abb. 24 zu entnehmenden, Strategie sequenziert (insgesamt 1634 Nukleotide). Außerdem erwies sich die Sequenzanalyse dieses Gens im Hinblick auf die Extendierung der A-Region im 5'-terminalen Bereich als nützlich (2.4.2.1.). Unter Einsatz der Probe m607V-3 (31), welche exakt in ihrer V_K -Sequenz derjenigen von A3 entspricht, konnte ein, die Region Aa extendierendes, Cosmid aus der Genbank IIIC isoliert werden.

In Abb. 25 ist die Nukleotidsequenz zusammen mit der translatierten Aminosäuresequenz dargestellt. Gen A3 stellt ein typisches Gen der Subgruppe II dar. Keine der für diese Subgruppe charakteristischen, invarianten Aminosäuren, d.h. Aminosäuren, die mit mindestens 95 % Wahrscheinlichkeit an bestimmten Positionen des Proteins vorkommen (22), ist ausgetauscht. Das Gen A3 ist potentiell funktionell, denn im Leseraster liegen keinerlei Stoppcodons vor, die Signalsequenzen (Nona- und Hepta-Sequenzen; Ref. 15, 16) und die Spleißsequenzen (85) entsprechen den üblichen Consensussequenzen. Tatsächlich wurde von Klobeck et al. (31) das umgelagerte, exprimierte Äquivalent dieses Gens in der lymphoblastoiden Zelllinie GM 607 nachgewiesen, wobei lediglich ein einziger,

A3 (Aa)



A4 (Aa)

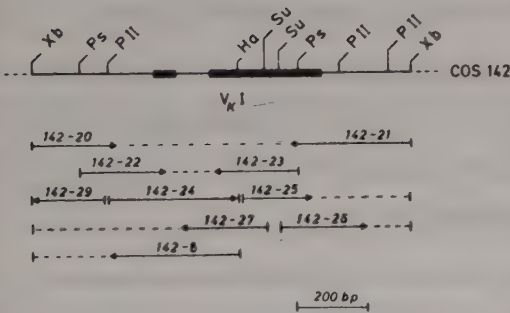


Abb. 24: Feinkartierungen und Sequenzierungsstrategie für die V_K -Gene A3 und A4

Dargestellt sind die Feinkartierungen der beiden Fragmente aus cos 142 (Aa), welche die V_K -Gene A3 und A4 (Abb. 16 und 20) tragen. Für die Kartierung wurden Nukleasen verwendet, die in den M13-Phagenvektor klonierbare Restriktionsenden erzeugen. Die durch Hybridisierung eingegrenzten Genregionen wurden gezielt in Fragmente zerlegt, die in geeigneter Orientierung in die M13-Vektoren zur Sequenzierung kloniert wurden. Die Daten bezüglich der Konstruktion der Subklone sind in Tab. 7 angegeben.

Die Pfeilrichtung gibt jeweils die Sequenzierungsrichtung an, die gestrichelte Linie markiert Bereiche, die auf dem jeweiligen Klon nicht mehr sequen-

ziert wurden. Bei den Sequenzierungsklonen wurde das Kürzel "m" (für 'M13-Klon') jeweils aus Platzgründen weggelassen. Durch geschlossene Balken sind die codierenden Genabschnitte markiert.

Bei den folgenden Abbildungen der Feinkartierungen und Sequenzierungsstrategien wurde entsprechend verfahren.

(stummer) Nukleotidaustausch an der Position 90 (G_{A3} zu C_{607}) vorliegt. Für diesen Basenaustausch gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten:

Abb. 25: Nukleinsäuresequenz des V_K II-Gens A3 (Region Aa)

In dieser, wie in den folgenden Darstellungen von Nukleotidsequenzen von V_K -Genen, sind die (potentiell) regulatorisch wichtigen pd- und dc-Sequenzen (86), die TATA-Box (85) und die V-J-Umlagerungs-Signalsequenzen (15, 16) durch Unterstreichung gekennzeichnet. Durch Vergleich mit veröffentlichten Aminosäuresequenzen (22) und unter Berücksichtigung der Intron-Exon-Spleißregeln (85) konnten die Grenzen der codierenden Regionen festgelegt werden. Über den Nukleotidsequenzen sind die formalen Translationsprodukte dargestellt. Die nach Kabat (22) invarianten, und damit Subgruppen-spezifischen Aminosäuren, sind durch Unterstreichung hervorgehoben. Positionen, an denen eine invariante Aminosäure gegen irgendeine andere ausgetauscht ist, wurden durch einen Strich über der entsprechenden Aminosäure markiert.

In den translatierten Bereichen wurden verschiedene V-Gen-Subsegmente gekennzeichnet: L, L' = Signalpeptid; FR 1, 2, 3 = "framework regions"; CDR 1, 2, 3 = "complementarity determining regions". Diese wurden durch Vergleich mit veröffentlichten (22) Proteinsequenzen bestimmt. Die Nukleotid- und Aminosäurepositionen sind am Rand angegeben. Position 1 für beide Zählweisen ist jeweils der Beginn der FR1-Region.

Folgende Abkürzungen für Metanukleotide wurden verwendet: B = A oder AA; D = C oder CC; H = G oder GG; V = T oder TT; R = A oder G; Y = C oder T; 5 = A oder C; 6 = G oder T; 7 = A oder T; 8 = C oder G.

Die Position, an der im Genbereich von A3 ein Basenaustausch im Vergleich zum exprimierten Gen der Zelllinie GM 607 vorliegt, ist durch ein Dreieck markiert.

Die Punktreihe symbolisiert einen nicht sequenzierten Bereich von etwa 300 bp, durch den die ferne 5'-Sequenz vom V_K -Bereich getrennt ist.

2.5.2.2. Durch Insertion einer Base ist das V_K -Gen A4 zu einem Pseudogen mutiert

Das V_K -Gen A4 liegt im 5'-terminalen Bereich der Aa-Region (Abb. 20) und konnte aufgrund der ausschließlichen Hybridisierung mit einer Probe der Subgruppe I (ml-3; Ref. 66) unter stringenten Bedingungen (0,1 x SSC, 68°C im letzten Waschschrift) eindeutig der Subgruppe I zugeordnet werden. Zur Bestimmung der 5'-3'-Polarität wurde A4 einer Sequenzanalyse unterzogen. Die entsprechende Sequenzierungsstrategie ist in Abb. 24b dargestellt. Die Nukleinsäuresequenz (1074 Basen) ist unter Abb. 26 zu finden.

Tabelle 7: Subklone der A-Regionen, die für die Sequenzierung ausgewählter V_K-Gene und zur Fragmentpräparation hergestellt worden waren

Cosmid, Gen	Subklon	Restriktionsenden des Fragmentes		Fragment- größe (bp)	M13-Vektor, Spaltung
		5'	3'		
cos 142, A3	p142-9	BglII	BglII	2300	pBR322 (BamHI)
	m142-10	BamHI	BamHI	1450	mp 8 (BamHI)
	m142-11	BamHI	BamHI	1450	mp 8 (BamHI)
	m142-12	XbaI	BamHI	750	mp10 (BamHI, XbaI)
	m142-13	SphI	SphI	840	mp18 (SphI)
	m142-14	SphI	SphI	840	mp18 (SphI)
	m142-15	SacI	BamHI	340	mp11 (SacI, BamHI)
	m142-16	BamHI	SphI	290	mp19 (BamHI, SphI)
	m142-17	PstI	PstI	280	mp10 (PstI)
	m142-18	PstI	PstI	280	mp10 (PstI)
cos 142, A4	m142-20	XbaI	XbaI	1050	mp10 (XbaI)
	m142-21	XbaI	XbaI	1050	mp10 (XbaI)
	m142-22	PstI	PstI	600	mp10 (PstI)
	m142-23	PstI	PstI	600	mp10 (PstI)
	m142-24	PvuII	HpaII	350	mp11 (SmaI, AccI)
	m142-25	HpaII	XbaI	480	mp10 (AccI, XbaI)
	m142-26	Sau3A	XbaI	390	mp11 (BamHI, XbaI)
	m142-27	XbaI	Sau3A	660	mp10 (BamHI, XbaI)
	m142-28	XbaI	HpaII	570	mp10 (AccI, XbaI)
	m142-29	XbaI	PvuII	230	mp11 (SmaI, XbaI)
	m142-30	BamHI	ClaI	900	mp11 (BamHI, AccI)
cos 516, A10	m516-5	HpaI	HpaI	1000	mp10 (SmaI)
	m516-6	HpaI	HpaI	1000	mp10 (SmaI)
	m516-7	PstI	HpaI	800	mp10 (PstI, SmaI)
	m516-8	HpaII	HpaI	270	mp10 (AccI, SmaI)
	m516-9	HpaI	XhoI	820	mp10 (SalI, SmaI)
cos 663 A26	m663-1	BglII	SmaI	700	mp10 (BamHI, SmaI)
	m663-2	SmaI	BglII	700	mp11 (BamHI, SmaI)
	m663-3	BglII	PstI	200	mp10 (BamHI, PstI)
	m663-4	PstI	SmaI	450	mp10 (PstI, SmaI)
cos 163 A20	m163-4	BglII	BglII	1100	mp 8 (BamHI)
	m163-5	BglII	BglII	1100	mp 8 (BamHI)
	m163-6	XbaI	XbaI	470	mp10 (XbaI)
	m163-7	XbaI	XbaI	470	mp10 (XbaI)
	m163-8	XbaI	XbaI	410	mp10 (XbaI)
	m163-9	XbaI	XbaI	410	mp10 (XbaI)

m163-10	BglII	SmaI	500	mp10 (BamHI, SmaI)
m163-11	BglII	SmaI	500	mp11 (BamHI, SmaI)
m163-12	XbaI	SmaI	740	mp10 (XbaI, SmaI)
m163-13	SmaI	SmaI	2300	mp 8 (SmaI)
m163-14	SmaI	SmaI	2300	mp 8 (SmaI)
m163-15	Sau3A	SmaI	150	mp11 (SmaI, BamHI)
m163-16	SmaI	TaqI	700	mp11 (SmaI, AccI)
m163-17	KpnI	KpnI	1300	mp18 (KpnI)
m163-19	Sau3A	Sau3A	850	mp 8 (BamHI)
m163-20	TaqI	TaqI	610	mp10 (AccI)
m163-21	TaqI	TaqI	140	mp10 (AccI)
m163-22	TaqI	TaqI	470	mp10 (AccI)
m163-23	Sau3A	SmaI	150	mp10 (BamHI, SmaI)
m163-24	TaqI	SmaI	150	mp10 (AccI, SmaI)
m163-25	TaqI	TaqI	480	mp10 (AccI)
m163-26	KpnI	KpnI	1300	mp18 (KpnI)
m163-27	Sau3A	Sau3A	200	mp 8 (BamHI)
m163-28	Sau3A	Sau3A	200	mp 8 (BamHI)
m163-29	SmaI	Sau3A	1100	mp10 (SmaI, BamHI)
m163-30	SmaI	TaqI	800	mp10 (AccI, SmaI)
m163-31	SmaI	KpnI	650	mp19 (KpnI, SmaI)

Die für die Bezeichnung der Klone verwendeten Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis (7.) aufgeführt. Bei denjenigen Subklonen, die dasselbe Fragment und dieselbe Vektorpräparation aufweisen, aber unterschiedliche Bezeichnungen tragen, liegt das klonierte Fragment in unterschiedlicher Orientierung im Vektor vor.

Wie auch die Verteilung der invarianten Aminosäuren beweist, handelt es sich bei diesem V_K -Gen eindeutig um einen Vertreter der Subgruppe I. Lediglich eine invariante Aminosäure ist ausgetauscht (Abb. 26). Allerdings stellt das V_K -Gen A4 ein Pseudogen dar: Aufgrund eines überzähligen Nukleotids (G) an Position 172 (Abb. 26) kommt es im (hypothetischen) Translationsprodukt zu einer Verschiebung im Leseraster, die mehrere Stopcodons nach sich zieht. Außerdem weist auch eine der Signalsequenzen Veränderungen auf: Das regulatorische Heptanukleotid CACAGTG (15, 16) ist zu CACTGTG verändert.

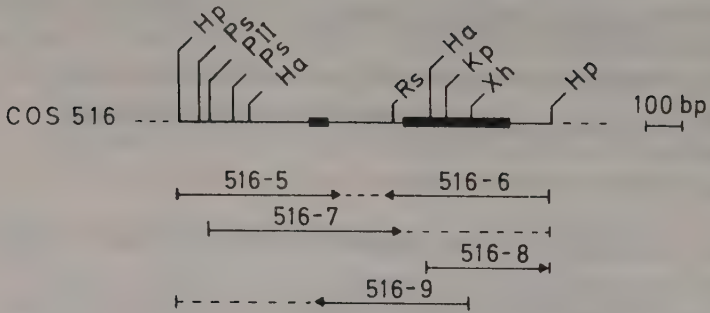
Proben jedoch keinerlei Hybridisierung. Um die Polarität dieser Gensegmente festlegen zu können, wurden deswegen die Nukleotidsequenzen (nach Feinkartierung der entsprechenden Bereiche) von A10 (Region Aa) und A26 (Ab; Abb. 20) ermittelt. Die Sequenzierungsstrategie für beide Gene und die entsprechenden Feinkartierungen sind Abb. 27a (A10) und 27b (A26) angegeben. Die Nukleotidsequenz von Gen A10 ist in Abb. 28, von Gen A26 in Abb. 29 dargestellt.

Im Falle von Gen A10 wurden 1041 bp analysiert, wobei zusätzlich zur eigentlichen Genregion etwa 150 bp aus dem 5'- und etwa 100 bp aus dem 3'-Bereich sequenziert worden waren. Die Signalsequenzen (Spleißstellen; pd-, dc-, TATA-Sequenzen; Nonanukleotid-Sequenz) weisen keine Abweichungen von denjenigen potentiell funktioneller V_K -Gene auf. Lediglich für die Heptanukleotid-Sequenz findet man einen Basenaustausch: statt des üblichen CACAGTG-Motivs liegt CACTGTG vor. Da in den codierenden Bereichen offene Leseraster vorliegen, die ein intaktes V_K -Protein gewährleisten würden, könnte dieses Gen funktionell sein, falls nicht die Mutation der Heptanukleotid-Sequenz eine Umlagerung, bzw. Aktivierung, dieses Gensegmentes verhindert.

Auffällig ist, daß die formal translatierte Aminosäuresequenz keiner der üblichen vier Subgruppen (22) eindeutig zugeordnet werden kann. Die unter 2.5.1. erläuterten Hybridisierungsversuche wiesen auf eine Verwandtschaft mit dem V_K -Gentypus der Subgruppe I hin. Allerdings sind im eigentlichen V_K -Bereich (FR1 - CDR3) neun von 37 invarianten Aminosäuren, also 24 %, ausgetauscht (s. Abb. 28). Im Vergleich zu Proteinsequenzen der Subgruppe III (22) findet man, daß 13 von 45, d. h. 29 % der invarianten Aminosäuren nicht vorliegen. Die Intronlänge von etwa 200 bp weist auf eine gewisse Verwandtschaft zur Subgruppe III hin. Eine Zuordnung zur Subgruppe II oder IV scheidet völlig aus.

Das V_K -Gen A10 (Region Aa) und sein Gegenstück A24 (Ab) könnten also aufgrund der geschilderten Sequenzabweichungen die ersten beiden Vertreter einer neuen, seltenen V_K -Subgruppe darstellen.

A 10 (Aa)



A 26 (Ab)

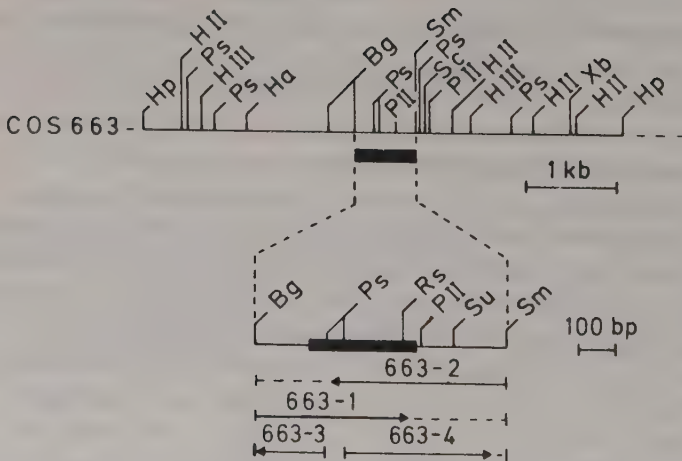


Abb. 27: Feinkartierungen und Sequenzstrategie der V_K -Gene A10 und A28

Gen A10 stammt aus der Region Aa. Diesem entspricht als homologes Gegenstück Gen A24 aus Region Ab (Abb. 20). Das homologe Gen zu A26 (Ab) stellt A12 (Aa) dar (Abb. 20). Die geschlossenen Balken markieren die codierenden Genregionen. Die Angaben zur Sequenzierungsstrategie entsprechen denjenigen, die in der Legende von Abb. 24 aufgeführt sind.

Waschschritt) ergibt das Fragment aus cos 663 (Ab), auf welchem der 5'-Genbereich von A26 liegen sollte, mit dem Subklon m6410-L (80), welcher eine V_K II-Signalpeptid-Sequenz trägt, kein Signal.

Bereits das vergleichsweise schwache Hybridisierungssignal (1 x SSC, 68°C im letzten Waschschritt), das mit der Probe m607V-3 (31) bei der Lokalisierung von A12, bzw. A26 erhalten worden war, deutete darauf hin, daß ein ungewöhnliches V_K -Gen vorliegen könnte. Das Ausbleiben von Signalen bei Einsatz der Hybridisierungsprobe m6410-L (80), zum Zwecke der Bestimmung der Genorientierung, wies ebenfalls auf eine Sequenzdivergenz dieses Gensegmentes hin. (Mit Proben der anderen Subgruppen waren keinerlei Hybridisierungssignale erhalten worden.)

Die Sequenzanalyse, bzw. das formale V_K -Translationsprodukt, zeigten, daß eine erhebliche Abweichung von Sequenzen der Subgruppe II (22) vorliegt: von 53 invarianten Aminosäuren, wie sie für V_K -Gene dieser Subgruppe charakteristisch sind (22), sind 17 (32 %) ausgetauscht.

Abgesehen von der divergenten Aminosäure-, bzw. Nukleinsäure-Sequenz, weist Gen A26 im Strukturgenbereich (FR1 - CDR3) Besonderheiten auf:

- Zusätzlich zu den beiden kanonischen Cysteinresten an den Positionen 23 und 88, welche durch eine Disulfidbindung die Tertiärstruktur der V-Proteindomäne wesentlich mitbestimmen, ist ungewöhnlicherweise an Position 46 ein drittes Cystein gegeben. Da somit für die Ausbildung einer Disulfidbrücke drei statt nur einer Kombinationsmöglichkeiten denkbar sind, kann man wesentliche Auswirkungen auf Faltung und Form der Proteinkette erwarten.

- Eine weitere Besonderheit der Aminosäuresequenz besteht darin, daß an der Position -1, also der Übergangsstelle zwischen L' - einem Anteil der Signalpeptid-Sequenz - und der FR1-Region die üblicherweise vorliegenden sauren Aminosäuren Glutamat oder Aspartat (22) gegen das basische Lysin ausgetauscht sind. Diejenigen Proteasen, die das V_K -Signalpeptid abspalten, könnten möglicherweise aufgrund ihrer Sequenzspezifität hier nicht hydrolytisch wirksam sein.

										(L)	-5
AAGATCTCTCTCCCTGCGTACCCCTAGCTCAGBGTGTCTTACGTTTGTATAGCTTCTACCTTATGGATGCTGTAAAGTTATCTCTCATTGTCTGGAT										VallileLeuSerPheAlaGluP	-15
FR1										CDR1	27 A
heLeuTrpGluLysLysSerLeuGlnValWaiIleLeuArgLeuGlnThrProLeuPheLeuGluGluProSerSerIleSerCysArgSerGluValGlnSe											24
TCTTGTGGGAAAAAAATCCCTCCAGGTTACATCTCTGAGACTTCAGACTCCACTCTCTCTTGGAGACCCCTCCATTCTCTGCAAGCTCTGGTCAAG											36
B C D E										FR2	
pProGlnHisArgAsnGluValAsnThrIleLysAsnTrpPheLeuGlnLysProArgGlnProLeuArgCysLeuIleIleThrGluValSerAsnArgLysSer											47
CCCTTTTCATAGAAATGGAACACTTACTTGAATGGTTCTCTCAGAGGACGACCAACCTCTAAGGTGCTGCTGATTATGAACTTCTCAACAGGAAGTCT										CDR2	186
FR3										CDR3	
GluValIleThrGluArgPheSerSerSerGluSerGluThrAsnPheIleLeuLysLysSerArgValGluAlaGluAsnValGluValIleThrIleCysLeuGlu											9
GGGCTCTCGGCAAGTTTCAACAGAGTGGTTCAGGACAGATTTTCATATTGAAATCAGCAGGATGAGAGCTGAGGACCTTGGGTGTTTATTACTGCTCTG											286
InGluThrGlnValPro											95
AAGGTACACAGATGCTCTCCACAGTGTGACACCCCTGAATACAAAGCTCCCTGCTTGGAGTGCCCAAGCTGCTCAAAATATGTTGTTTACTTGGGAGTGG											386
CACAACAGAACTCTGCTGTATAGATGAAGATGTTGGGCCAGGCCGGGAGATCATAGGTCAAAGTTTGAGACCAAGCCCAACAATGTTGAACCC											486
CTATCTCTACTAAAAATACAAAATTAGCTGGATGTGGTGGTGCAGCCCTGTAATCTAGTTACTCAGGAGGCTGAGGCAGGAGAAATAGCTTGAACCCGG											586
											587

lich findet man an Position -2 auch die saure Aminosäure Glutamat, die einen spezifischen proteolytischen Angriff an dieser Stelle erlauben sollte.

Das Gen A26 (bzw. A12) stellt also in mehrfacher Hinsicht eine Besonderheit dar. Es ist wahrscheinlich, daß diese beiden Gensegmente der A-Regionen die Vertreter einer neuen Subgruppe sind. Aufgrund der Strukturdaten liegen keine Hinweise vor, daß es sich bei diesen Genen um Pseudogene handeln sollte.

2.5.2.4. Das Gen A20 (A6) ist durch die Insertion eines mobilen, repetitiven Elementes (in den Intronbereich) inaktiviert worden

Bei den V_K -Genen gibt es eine Reihe von Ereignissen, die ein V_K -Gen zu einem Pseudogen verändern können: Abgesehen von Mutationen in den codierenden Bereichen (Stopcodons, Deletionen) können Veränderungen in den Signalsequenzen eine Umlagerung oder Transkription von V_K -Genen verhindern. Auch die Translokation auf andere Chromosomen sollte einen Pseudogencharakter zu Folge haben, da eine Umlagerung dieser Gensegmente interchromosomal sehr unwahrscheinlich ist. Für die beiden homologen Gene A6 und A20 wurde eine, für die V_K -Gene des Menschen, neue Art an Pseudogenen gefunden: Es handelt sich dabei um die Zerstörung der V-Genstruktur hervorgerufen durch die Insertion eines repetitiven Sequenzelementes.

Die mit A6 und A20 (Abb. 13, 16 und 20) bezeichneten V_K -Gene liegen in den Regionen Aa und Ab in sehr homologer Form vor. Dies hatten sowohl die Feinkartierung beider Gene samt Flankenabschnitten (Abb. 18) als auch Hybridisierungen mit verschiedenen V_K -Proben (s. u.) gezeigt. Die Sequenzierung wurde für Gen A20 (Region Ab) vorgenommen; aufgrund der ausgeprägten Homologie sollten die dabei gewonnenen Strukturdaten im wesentlichen auch für A6 (Aa) gelten.

Der Bereich der Gene A6 und A20 zeigte in zweierlei Hinsicht Besonderheiten:

- Zum einen waren die beiden codierenden Genbereiche dieser Gene (Signalpeptid- und Strukturgen-Bereich) durch ein, für ein V_K -Gen ungewöhnlich großes Intron von 1,4 kb voneinander getrennt. Es lag zunächst die Vermutung nahe, daß es sich um zwei verschiedene, eng benachbarte V_K -Gene handle. Allerdings zeigte das "Gen" aus dem 5'-Bereich nur Hybridisierung mit der Probe m21-4 (79).

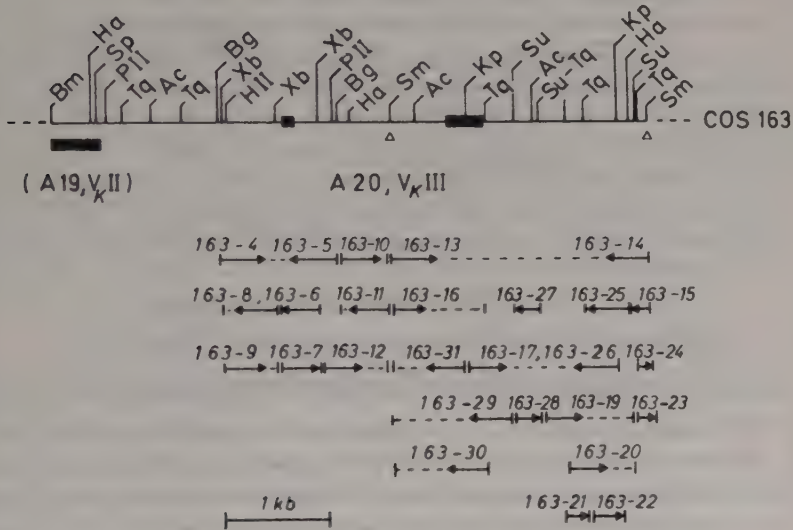


Abb. 30: Feinkartierung und Sequenzierungsstrategie für das Gen A20

Dargestellt ist die Feinkartierung eines Unterbereiches aus Region Ab (Abb. 16, 20). Die Bezeichnungen und Abkürzungen zur Erklärung der Sequenzierungsstrategie entsprechen denjenigen, wie sie in der Legende von Abb. 24 aufgeführt sind. Ein Teil der Feinkartierung ist durch zwei offene Dreiecke eingegrenzt. Nur für diesen Bereich sind die Sau3A-Spaltstellen kartiert und eingezeichnet. Die ausgefüllten Balken stellen die codierenden Bereiche von Gen A20 dar. Die Position des 3'-terminalen Anteiles von Gen A19 ist ebenfalls mit einem ausgefüllten Balken markiert.

Abb. 31: Nukleinsäuresequenz des Gens A20, samt 5'- und 3'-Flankenbereichen, sowie einem inserierten Sequenzelement

Bereiche des Gen- und Flankenbereiches von A20 (Region Ab) sind dargestellt (3862 Nukleotide). Die Abkürzungen und Symbole, wie sie zur Kennzeichnung des V_K -Gens verwendet sind, entsprechen denjenigen, die in der Legende zu Abb. 25 aufgeführt und erklärt sind.

Auf Besonderheiten des V_K -Gens wurde folgendermaßen hingewiesen: Ein offenes Dreieck K markiert die Insertion einer Base. Zwischen den Aminosäurepositionen 29 und 31, bzw. 56 und 65 mußte (bei Vergleich zu Proteinsequenzen der Subgruppe III) eine Deletion von 1, bzw. 8 Aminosäuren angenommen werden. An Position 80 wurden zwei, mit 80A und 80B gekennzeichnete, Aminosäuren vermerkt.

Die Insertionsstellen des transposablen Elementes sind mit zwei ausgefüllten Dreiecken markiert. Das durch Insertion des transposablen Elementes duplizierte Pentanukleotid GTTTT aus dem Intronbereich des V_K -III-Gens ist mit kurzen Pfeilen gekennzeichnet. Auf die direkten, nicht perfekten Sequenzwiederholungen an den Grenzen des mobilen Elementes ist mit unterbrochenen Pfeilen hingewiesen. Eine Klammer mit zwei offenen, vertikalen Pfeilen markiert die Position, an der das Dinukleotid TG vielfach wiederholt vorliegt. Die Grenzen des Alu-Elementes sind durch zwei kleine Pfeile und die Bezeichnung "Alu" angegeben. Ein ausgefüllter Kreis weist auf eine A-reiche Region im 5'-Bereich des Gens hin.

Dieser Subklon trägt nur die Signalpeptid-Sequenz einschließlich Anteilen des Introns eines V_K -Gens der Subgruppe III. Ein Signal mit der Strukturgen-Probe m41V-7 (79) wurde dagegen nicht erhalten (Bedingungen: 1 x SSC, 68°C im letzten Waschschrift). Für das andere, 1.4 kb in 3'-Richtung entfernte "Gen" (Abb. 18) wurde bei Einsatz der eben erwähnten Proben das Umgekehrte gefunden.

- Die geringe Signalstärke bei Einsatz der Probe m41V-7 (Strukturgen-Probe) für den 3'-Genanteil war auffallend (1 x SSC, 68°C im letzten Waschschrift).

- Im Bereich zwischen den hybridisierenden Genanteilen konnte mit radioaktiv markierter Plazenta-DNA eine repetitive Sequenz nachgewiesen werden. Repetitive Sequenzelemente im Intronbereich von V_K -Genen des Menschen waren bis zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt.

Aufgrund dieser Besonderheiten wurde Gen A6 in einem Bereich von 3,8 kb einer Sequenzierung unterworfen. Die zugehörige Feinkartierung und die dabei angegebene Sequenzierungsstrategie sind in Abb. 30 angegeben. Die ermittelte Sequenz (etwa 600 bp der 5'-Flanke, Signalpeptid-, Intron- und Insertionssequenz, Strukturgenanteil und etwa 1,5 kb der 3'-Flanke) ist in Abb. 31 dargestellt.

Wie ein Vergleich des formalen Translationsproduktes des Strukturgenbereiches mit Proteinsequenzen der Subgruppe III (22) zeigte, könnte es sich um ein stark divergentes V_K -Gen der Subgruppe III handeln (15 von 40 invarianten Aminosäuren, also 38 %, sind ausgetauscht) oder auch um den Vertreter einer bisher unbekannten, neuen Subgruppe. Versucht man A20 als Gen der Subgruppe III zu klassifizieren, so muß man an der Position 30 die Deletion einer Aminosäure, an Position 57-64 die Deletion von acht Aminosäuren und an Position 80 die Insertion von zwei Aminosäuren berücksichtigen (Abb. 31). Auch das Signalpeptid ist mit 22 Aminosäuren um eine Aminosäure länger als die bekannten Signalpeptide dieser Subgruppe (79, 56, 69).

Abgesehen von der Zerstörung der Genstruktur durch die Insertion einer repetitiven Sequenz, ist dieses Gen aufgrund folgender Veränderungen eindeutig als Pseudogen zu klassifizieren (Abb. 31): An der Nukleotidposition 82 erzeugt eine überzählige Base eine Verschiebung im Leseraster. Bei der (Nukleotid-) Position 95-97 liegt ein Stopcodon vor. Auch die Heptanukleotidsequenz weist deutliche Veränderungen auf: Statt CACAGTG findet man CATACTG.

Ein Sequenzvergleich der vorliegenden Nukleinsäuresequenz mit derjenigen eines potentiell funktionellen Gens der Subgruppe III, V_g (L-Region; Ref. 79), hatte erbracht, daß exakt an der Position -1219 bzw. -31 (Abb. 31) die Insertion einer Sequenz im Intronbereich erfolgt war. Die Tatsache, daß es sich um die Insertion eines transposablen Elementes handelt, ist daran zu erkennen, daß das Pentanukleotid GTTTT aus dem V_K III-Intron an der Insertionsstelle dupliziert vorliegt (87). Das inserierte Sequenzelement von 1188 bp Länge weist an seinen 5'- und 3'-Rändern di-

rekte, unterbrochene Sequenzwiederholungen von etwa 100 bp Länge auf - neben der Sequenzduplikation (GTTTT) ein weiteres Indiz, daß es sich um ein tranposables Element handelt (87). Die inserierte Sequenz trägt zwei repetitive Sequenzen (Abb. 31): einerseits ein Mitglied der Alu-Sequenzfamilie (88) und andererseits das Sequenzmotiv einer sog. "simple sequence"; das Dinukleotid TG liegt siebzehn Mal in Reihe wiederholt vor.

Die Insertion muß zu einem Zeitpunkt vor der Duplikation der "Ur-A-Region" erfolgt sein, da auch für A6 eine Veränderung der Genstruktur nachweisbar war. In diesem Fall findet man ebenfalls eine repetitive Sequenz im Intronbereich. Es wäre möglich, daß diese Veränderung den Ausgangspunkt für die Mutation dieser Gene, zumindest für A6, bildete. Kryptische Spleißstellen im unverhältnismäßig großen Intron sollten bei dem sonst intakten Gen zu aberranten Transkripten führen.

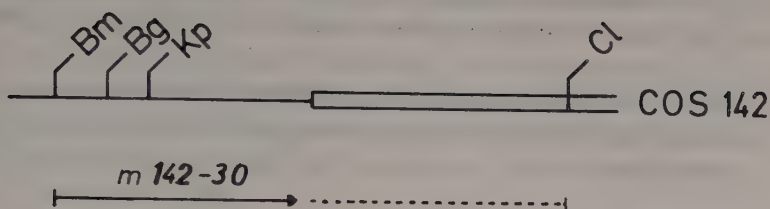
Analoge Fälle von Insertionen in Intronbereiche von Genen sind für zwei V_K -Gene der Maus bekannt (89). Es handelt sich dabei um die Insertion von Sequenzen der sog. intracisternalen A-Partikel in den Intronbereich dieser V-Gene. Auch für das β -Tubulin-Pseudogen der Ratte (90) und das Rattenwachstums-Hormon (91) wurden Insertionen repetitiver Elemente in Intronbereiche nachgewiesen.

Eine weitere auffällige Besonderheit findet man im 5'-Abschnitt des Genbereichs, jenseits der Signalpeptid-Sequenz (Abb. 31). Es handelt sich dabei um eine Sequenz, der durch die Abfolge vieler Adenosinbasen gekennzeichnet ist. Möglicherweise kam es an dieser Stelle zu einer Integration eines Retrotranskriptes. Bei der Suche nach Sequenzhomologien in Humansequenzen (EMBL-Datenbank) konnten bei Suchbedingungen von 70 % geforderter Homologie keine verwandten Sequenzen gefunden werden.

2.5.2.5. Nukleinsäuresequenz einer Subregion aus cos 142, die mit einer V_K III-Probe ein sehr schwaches Kreuzhybridisierungssignal ergab

Bei nichtstringenten Bedingungen (2 x SSC, 68°C im letzten Waschschritt) hatte ein Subbereich aus cos 142 (Aa) mit den Proben der Subgruppe III (m21-4; Ref. 79) und der Subgruppe I (m1-3; Ref. 66) ein äußerst schwaches Hybridisierungssignal ergeben. Es handelte sich um ein 900 bp BamHI-ClaI-Fragment aus dem 3'-Bereich von cos 142 (Abb. 13 und 16). Keine der anderen Subgruppenproben ergab unter denselben Hybridisierungsbedingungen mit diesem Bereich ein Signal.

Ein Subklon, der diesen Bereich repräsentiert (Abb. 32), wurde konstruiert und 424 bp der Sequenz (einzelsträngig) bestimmt (Abb. 32), um zu klären, ob an dieser Stelle der A-Region ein divergentes V_K -Gen vorliegt. Der 3'-Anteil des klonierten BamHI-Fragmentes (349 bp) stellt ein Teilstück des Cosmidvektors pHc 79 dar, sodaß der sequenzierte Anteil nahezu die gesamte zu untersuchende Sequenz abdeckt. Mit Hilfe eines Rechenprogrammes, das Sequenzhomologien in einer Punkt-Matrix-Darstellung abbildet (4.2.12.), wurde die vorliegende Sequenz unter verschiedenen Suchbedingungen (mindestens 60 % Homologie) mit Sequenzen der Subgruppen I bis IV und denjenigen der Gene A10 und A26 (2.5.2.3.) verglichen. Es konnten jedoch keinerlei signifikante Homologien gefunden werden. Lediglich der Vergleich mit der Sequenz des V_K I-Gens V1 (66) ergab, daß drei kleine Teilbereiche von etwa 20 bp Länge eine geringe Homologie (60 - 65 %) zum CDR2/FR3-Anteil des Gens V1 aufweisen (Abb. 32, unterstrichene Bereiche). Wahrscheinlich handelt es sich dabei um zufällige Übereinstimmungen. Diese könnten auch die Ursache für die sehr schwachen Hybridisierungssignale darstellen.



GGATCCAGTTTCAGCTTTCTACATATGGCTAGCCAGTTTCCAGCACCA	50
TTTATTAAATAGGGAACTCTTTCCATTTGTTTTGTGAGGTTGTCAAA	100
GATCTGATGGTTGTAGATATGTGGCACTATTTGTGAGGCTCTGTCTGT	150
TCCATTGGTTTGTATCTCTGTTTTGGTACCACTACCATGCTGTTTGTGTT	200
ATTGTAGCCTTGTAGTATAGTTTGAAGTCAGGTAGTGTGATGCTCAGCG	250
<u>TTGTTCTTTTGGCTTAGGATTGACTTGGCAATGCGGGCTCTTTTTTGGTT</u>	300
CCATATGAACTTTAAAGTAGTTTTTCTAATTCTGTGAABAAAGTCAATG	350
GTAGCTTGATGGGGATGACATTGAATCTATAAATTACCTTGHCAGTATGG	400
GATTTCACATATTGATTCTTTCTAC	424

Abb. 32: Nukleinsäuresequenz einer schwach mit V_I-Proben (I und III) hybridisierenden Subregion aus cos^K142

Die Restriktionskarte stellt einen Unterbereich von cos 142 (Abb. 13) dar und weist auf den Sequenzierungsklon m142-30 hin. Mit einem offenen Balken ist der Bereich des Cosmidvektors pH_C 79 gekennzeichnet.

Diejenigen Teilbereiche der Sequenz, die bei Sequenzvergleich mit V_I (V_I-Gen; Ref. 66) geringe Homologie zeigten (60 - 65 %), sind durch Unterstreichung markiert. Die Symbole der Metanukleotide sind in der Legende zu Abb. 25 erläutert.

2.6. Strukturuntersuchungen und Grobkartierung der V_K -Multigenfamilie mit Hilfe der Puls-Feld-Gel-Elektrophorese (PFG)

2.6.1. Die PFG-Elektrophorese als Methode der Wahl für die Strukturanalyse von Genregionen im Bereich mehrerer Megabasen

Bei der üblichen Gelelektrophorese (92), die bei konstantem, homogenem elektrischem Feld durchgeführt wird, erreicht man auf Grund des Siebeffektes der Gelmatrix eine Größentrennung der DNA-Moleküle mit hoher Auflösung, wobei die Grenze der Auftrennung bei Molekülgrößen von etwa 20 kb liegt. Sobald der Durchmesser der DNA-Partikel denjenigen der größten Poren im Agarosegel überschreitet, können die DNA-Moleküle nur unter Veränderung ihrer Knäuelstruktur in eine langgestreckte Form durch die größten Poren hindurchschlüpfen. In diesem Fall ist der Siebeffekt aufgehoben. Alle sehr großen DNA-Fragmente wandern langsam, aber mit gleicher Geschwindigkeit im Gel - ein Phänomen, das man als "Rep-tation" bezeichnet.

Die Technik der Puls-Feld-Gel-Elektrophorese (PFG; Ref. 36, 37, 38, 93) ermöglicht die Auftrennung auch sehr großer DNA-Moleküle bis in einen Größenbereich von mehreren Megabasen (37). Mehrere Varianten dieser Technik wurden entwickelt (36, 38, 94, 95). Das Grundprinzip besteht darin, daß die DNA-Partikel einem periodischen Wechsel zweier (inhomogener) elektrischer Felder unterworfen werden. Bei jedem Feldwechsel benötigt ein langgestrecktes DNA-Molekül je nach Größe einen bestimmten Anteil der aktuellen "Pulszeit", um zu relaxieren, um also Gestalt und Orientierung so zu ändern, daß eine Konformation erreicht wird, die eine Wanderung in Richtung des nunmehr herrschenden Feldes gestattet. Die Relaxationszeit ist hierbei dem Molekulargewicht proportional. Auftrennung bis in den Größenbereich mehrerer Mb (2-3) ist möglich.

Bettet man Zellen in Agarose ein und entfernt Proteine und Lipide (37), so schützt man die chromosomale DNA vor dem Einfluß von Scherkräften und kann durch Einsatz selten spaltender Restriktionsnukleasen sehr große Fragmente definierter Größen er-

zeugen. Benachbarte Genloci, wie z.B. die verschiedenen Regionen der auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 lokalisierten V_K -Regionen (10, 33, 34, 67, 69, vorl. Arbeit), sollten strukturell in Beziehung zu setzen sein, indem man Einzelspaltungen durchführt, die hochmolekulare DNA-Fragmente auf Nitrozellulose transferiert, mit spezifischen Proben der einzelnen Regionen hybridisiert und nach Kopplungen sucht.

2.6.2. Stellt die für die Strukturanalyse eingesetzte Zelllinie ein geeignetes Untersuchungsobjekt dar und wie zuverlässig ist das gewählte DNA-Spaltsystem ?

2.6.2.1. Liegt der V_K -Locus in der Prostata-Carzinom-Zelllinie (PC3) vollständig vor ?

Für diese Untersuchung der Gesamtstruktur des V_K -Locus war eine Zelllinie mit folgenden Eigenschaften zu wählen: Human-Zelllinie, Vollständigkeit des V_K -Locus (Keimbahnsituation) und problemlose Kultivierbarkeit bei guter Zellausbeute. Dies trifft auf die verwendete Prostata-Carzinom-Zelllinie (PC3; Ref. 96) zu. Eigentlich ist nur bei B-Zelllinien mit einer Umlagerung und strukturellen Veränderung des V_K -Locus zu rechnen. Im Laufe der Etablierung und Propagierung von Zelllinien kann es jedoch zu Chromosomenbrüchen, Deletionen und Translokationen kommen (97). Aus diesem Grund wurde möglichst repräsentativ überprüft, ob die bekannten Bereiche des V_K -Locus im Genom der PC3-Zelllinie vorliegen oder ob größere Bereiche deletiert worden sind.

Zu diesem Zweck wurde PC3-DNA mit verschiedenen, relativ häufig spaltenden Restriktionsnukleasen (BamHI, BglII, EcoRI, Hind III) behandelt und die auf Nitrozellulose transferierten DNA-Fragmente mit Proben der Subgruppe I (m1-3; Ref. 66) und II (m607 V-3; Ref. 31) hybridisiert. Diese Proben erkennen unter geeigneten Bedingungen einen beträchtlichen Anteil der bekannten V_K -Gene (31, 98). Daher sollte ein Vergleich der Hybridisierungs-Bandenmuster von PC3-DNA mit bekannten Hybridisierungsdaten (31, 98)

eine gute Abschätzung erlauben, inwieweit die V_K -Genfamilie in der PC3-Zelllinie repräsentiert ist. Die Autoradiogramme (Abb. 33, Subgruppe I) wiesen hinsichtlich der Zahl der Banden, der Größe der hybridisierenden Fragmente und der Bandenintensitäten keine signifikanten Unterschiede zu den vergleichbaren Literaturdaten auf (31, 98). Lediglich bei sehr schwachen Banden im Bereich

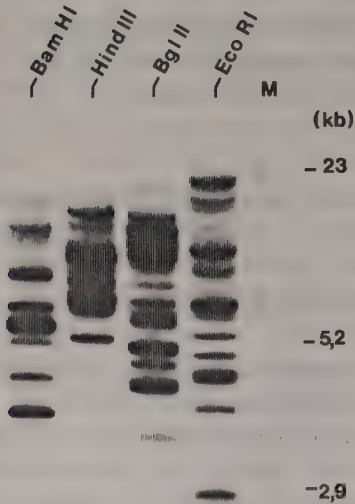


Abb. 33: Hybridisierung von gespaltenen DNA der Prostata-Carzinom-Zelllinie PC3 mit der für Subgruppe I spezifischen Probe ml-3 (66)

Jeweils 10 µg PC3-DNA, gespalten mit BglII, Bam HI, EcoRI und HindIII, wurden auf einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt, anschließend auf Nitrozellulose transferiert und mit der radioaktiv markierten Probe ml-3 (66) hybridisiert. Der letzte Waschschrift erfolgte bei 0,5 x SSC und 68°C. Die Fragmentgrößen des Hybridisierungsmarkers "M" sind am Bildrand in kb angegeben.

großer DNA-Fragmente waren Unterschiede feststellbar, was darauf zurückgeführt werden kann, daß große DNA-Fragmente verhältnismäßig schlecht aus Agarosegelen auf Nitrozellulose transferiert

werden. Außerdem hat bereits eine geringe Abänderung der Versuchsbedingungen (entsprechend den Literaturdaten gewählt) gerade bei schwach kreuzhybridisierenden Sequenzen einen merklichen Einfluß auf die Bandenintensitäten zur Folge.

Der Kontrollversuch mit Proben der Subgruppe I und II konnte als ausreichend angesehen werden. Ein entsprechendes Experiment mit einer Subgruppe III-Probe erschien aufgrund der ausgeprägten Sequenzheterogenität dieser Subgruppe (99) nicht ratsam. Außerdem darf man, da einerseits die V_K -Gene der Subgruppen I, II und III in gemischter Reihenfolge in der V_K -Genfamilie angeordnet vorliegen (33, 34, vorl. Arbeit) und andererseits die V_K -Gene der Subgruppe I und II vollzählig nachgewiesen wurden, eine weitgehende Repräsentation der Mitglieder der Subgruppe III annehmen.

2.6.2.2. Möglichkeiten und Grenzen des gewählten DNA-Spaltsystems

2.6.2.2.1. Drei verschiedene Möglichkeiten, DNA spezifisch in sehr große Fragmente zu zerlegen

Für die Erzeugung großer DNA-Fragmente (mehrere hundert kb) von definierter Länge stehen derzeit drei verschiedene Systeme zur Verfügung:

- Im einen Fall handelt es sich einerseits um den Einsatz spezieller Methylasen, welche die, in ihren Erkennungssequenzen enthaltene Base Adenin, methylieren. Auf diese Weise werden in an sich unmethylierter DNA aus zwei unmittelbar benachbart liegenden Methylaseerkennungs-Sequenzen DpnI-Spaltstellen generiert, wobei es sich schließlich um Erkennungssequenzen einer effektiven Länge von bis zu 12 bp Länge handeln kann (100). (DpnI spaltet nur, wenn Adenin in seiner Erkennungssequenz methyliert ist.) Da die Methylierung von DNA in diesem System aber nur unvollständig erfolgt (101), wurde diese Möglichkeit zur Zerlegung von DNA in große Fragmente nicht gewählt.

- Bei der zweiten Möglichkeit der DNA-Spaltung in große Fragmente nutzt man die Methylierung des Dinukleotids CpG in eukaryotischer DNA (53) aus. Meist liegt dabei Cytosin in methylierter Form (^5mC) vor (54). Allerdings existieren - zumindest im Mausgenom - Bereiche mit hohem und niedrigem Methylierungsgrad (102). Durch den Einsatz von Endonukleasen, wie SmaI, NaeI, SacII, die bei Methylierung von Basen aus ihrer Erkennungssequenz DNA nicht spalten, sollte man nur in Methylierungsfreien "Inseln" eine Spaltung und somit Fragmente großer Länge erhalten. Versuche mit PC3-DNA, also Spaltung mit den oben genannten Enzymen und Hybridisierung mit Proben aus dem V_K -Locus erbrachten jedoch nur (hybridisierende) Fragmente von etwa 100 kb. Dies kann auf den auffallend niedrigen Methylierungsgrad dieser Zelllinie (s.u.) zurückgeführt werden.

- Die dritte Möglichkeit, DNA spezifisch in große Fragmente zu zerlegen, wurde gewählt: Selten spaltende Restriktionsnukleasen wie NotI oder SfiI, die Erkennungssequenzen von 8 bp Länge aufweisen, wurden eingesetzt. Auch Enzyme mit einer Erkennungssequenz von 6 bp Länge, die ein- oder mehrmals das, in eukaryotischer DNA unterrepräsentierte, CpG-Dinukleotid (53) enthalten, wie BssHII, ClaI, MluI, NruI, PvuI, SalI und XhoI, erschienen als geeignet. Dabei war es zusätzlich von Vorteil, daß die Enzyme ClaI, NruI, PvuI, SalI und XhoI zur Kartierung der klonierten V_K -Regionen in der Arbeitsgruppe verwendet worden waren (33, 34, 57, 65, 67, 69, vorl. Arbeit) und somit interne Kontrollen und Anhaltspunkte ergaben. Die theoretische Spalthäufigkeit der erwähnten Enzyme (unter der Berücksichtigung der Dinukleotidhäufigkeiten (53) im Eukaryotengenom) ist bekannt (103). In Übereinstimmung damit wiesen die durch Restriktionsspaltung erzeugten DNA-Fragmente Größen von 1-2 Mb und mehr auf (Abb. 34, 35).

2.6.2.2.2. Versuche zur Klärung der Frage, welchen Einfluß der Methylierungsgrad der PC3-DNA auf die Spaltaktivität selten schneidender Restriktionsenzyme ausübt

Der günstige Umstand, daß Nukleasen, die CpG in ihrer Erkennungssequenz enthalten, eukaryotische DNA relativ selten spalten, wird in diesem Zusammenhang durch folgenden Nachteil beeinträchtigt: Viele dieser Nukleasen werden im Falle der Methylierung der Base Cytosin (54), inhibiert (104, 105). Aus diesem Grund wurde die PC3-DNA auf den Anteil an 5-m-Cytosin untersucht. Dies wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Th. Müller, Institut für Genetik der Univ. Köln, durchgeführt. Die HPLC-Analyse ergab, daß ein relativ geringer Prozentsatz an Cytosin methyliert war: 1,0 % (+/- 0,3%) 5-m-C bezogen auf die Gesamtkonzentration an Nukleotiden. Im Vergleich dazu lag der Wert für Plazenta-DNA (St) bei 6,1 % (+/- 0,3 %). Aufgrund des geringen Methylierungsgrades war die PC3-Zelllinie für diese Untersuchungen, bzw. DNA-Spaltungen, sehr geeignet.

Durch folgenden Kontrollversuch wurde aber auch gezeigt, daß man selbst bei diesem geringen Methylierungsgrad der DNA Partialspaltungen im Falle von DNA-methylierungssensitiven Nukleasen nicht völlig ausschließen kann: PC3-DNA wurde sowohl mit der Nuklease HpaII (keine Spaltaktivität bei Methylierung, C^mCGG) als auch mit der isoschizomeren Nuklease MspI (Aktivität trotz Methylierung) gespalten. Nach Transfer der DNA auf Nitrozellulose wurde mit einer radioaktiv markierten, spezifischen Probe hybridisiert. (Es handelte sich dabei um den Klon "Leu2/T8 (4.1.4.). Die klonierte DNA dieses Klons liegt in nur einer Kopie im Humangenom vor.) Im Falle von MspI-gespaltener DNA erkannte der markierte Klon zwei DNA-Fragmente von 2,1 und 0,5 kb Größe. (Offensichtlich liegt innerhalb der untersuchten Sequenz eine MspI-Spaltstelle vor.) Für HpaII-gespaltene DNA wurden vier hybridisierende Banden gefunden (4,4; 4,5; 5,4 und etwa 15 kb). Dies zeigt, daß (zumindest im Bereich des Leu2/T8-Gens) Methylierung nicht streng an spezifische Positionen gekoppelt ist.

Die verschiedenen, eingesetzten Nukleasen reagierten unterschiedlich auf mögliche Methylierung ihrer Erkennungssequenzen. Sowohl ein 15 kb ClaI-, als auch ein 26 kb XhoI-Fragment aus den homologen V_K -Regionen 0a und 0b (34, 68) konnte mit Hilfe der für den entsprechenden Bereich spezifischen Probe m217-1 (34) nachgewiesen werden, ohne daß Nebenbanden - zurückzuführen auf Partialspaltung - auftraten. Dasselbe traf auch für ein 10 kb XhoI-Fragment der Region Chr 22 (56) und ein 21 kb XhoI-Fragment der Aa, bzw. Ab-Region (vorl. Arbeit) zu. Der Einsatz von Proben, die sicher nur in einer Kopie pro (haploidem) Humangenom vorliegen, zeigte weiterhin deutlich, welche Enzyme sensitiv auf Methylierung ihrer Erkennungssequenzen reagierten und welche insensitive sind. Es handelte sich um die Proben pC-2 (C_K -Region; Ref. 175'), m111-7 (B-Region; Ref. 67), "Leu2A" und "Leu2B" (Dr. J. Parnes, Stanford). Angaben zu diesen Klonen sind in Tabelle 9 (2.6.3.) zu finden. Wie die Daten aus Tab. 8 zeigen (2.6.3.), ergeben die Spaltungen mit ClaI, NotI, NruI, PvuI, SalI, SfiI und XhoI mit diesen Proben jeweils nur eine einzige hybridisierende Bande. Für NotI waren sehr schwache Nebenbanden nachzuweisen. Sensitiv auf DNA-Methylierung reagierte insbesondere BssHII: Sowohl für die Probe der C_K - als auch diejenige der B-Region wurde ein Bandentriplett gefunden - ein eindeutiger Hinweis auf Partialspaltung.

2.6.2.2.3. Versuche zur Optimierung der Spaltbedingungen

Üblicherweise liegt DNA bei der Spaltung mit Restriktionsenzymen in Lösung vor. Zum Schutz vor Fragmentierung der hochmolekularen DNA durch Scherkräfte, war die chromosomale DNA in diesem Falle jedoch in eine Agarosematrix eingebettet. Die Restriktionsenzyme müssen also erst in die Agaroseporen diffundieren bevor Spaltung erfolgt. Aufgründdessen wurde exemplarisch für ein Enzym geprüft, inwieweit bei unterschiedlichen Verhältnissen von DNA zu Enzymmenge Partialspaltungen auftreten. Zu diesem Zweck wurden 2µg, 5µg und 10 µg PC3-DNA in Agarosematrix mit je 50 Einheiten SalI für 5 h inkubiert (4.2.4.2.), die DNA nach PFG-Elektrophorese auf

Nitrozellulose transferiert und mit einer Genprobe der Subgruppe I (ml-3; 66) hybridisiert. Für alle drei Spaltungen wurde ein völlig identisches Bandenmuster erhalten (Größe der hybrid. Fragmente s. Tab. 8). Man kann also von einer vollständigen Spaltung ausgehen. (Würde bei der höchsten Menge an Enzym pro DNA-Menge Partialsspaltung vorliegen, so wäre im Falle von wenig Enzym pro DNA-Menge ein unterschiedliches Partialmuster mit Fragmenten höherer Molekulargewichte zu finden gewesen.) Üblicherweise wurden 50 - 100 Einheiten an Enzym für 10 µg DNA (5 h) eingesetzt (4.2. 4.2.).

Eine DNA-Probe, die zum Vergleich nur mit SalI-Puffer - bei sonst identischen Bedingungen - behandelt worden war, sollte nach Hybridisierung zeigen, ob unspezifischer DNA-Abbau auftritt. Die Probe ml-3 (66) erkannte nur ein Fragment, das jenseits der Auflösungsgrenze (unter den Versuchsbedingungen etwa 1 Mb) lag. Es konnten nur wenig Abbauprodukte im Größenbereich von 50 - 100 kb nachgewiesen werden. Bei den meisten Experimenten wurde jeweils eine DNA-Präparation nur mit Spaltpuffer eines Enzyms behandelt, um zu prüfen, inwieweit Abbau der DNA vorlag. Diese Kontrollen zeigten, daß die DNA bei der Präparation intakt geblieben war, bzw., daß kein unspezifischer Abbau vorlag.

2.6.2.3. Eingesetzte Längenstandards und Genauigkeit der Größenbestimmung von Fragmenten einer Größe von mehreren Megabasen

Für die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten im Bereich zwischen 50 und 700 kb wurden Oligomere des Phagen λ eingesetzt. Für größere Fragmente diente chromosomale Hefe-DNA des diploiden Wildtyp-Hefestammes # 140 (4.1.2.) als Marker. Die Präparationen der chromosomalen Hefe-DNA waren von E. Geigl, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Neuherberg, München, freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden. Nur für die kleinen Hefechromosomen (bis 700 kb) ist die Chromosomenlänge relativ genau bekannt. Unter Berücksichtigung des Befundes, daß zwischen

Größe und Mobilität bei der PFG-Elektrophorese ein linearer Zusammenhang besteht (37, 101), wurde die Länge der großen Hefechromosomen durch Extrapolation bestimmt.

Die Inhomogenität der elektrischen Felder bei der PFG-Elektrophorese führt zu ausgeprägten Verzerrungseffekten, d.h. die DNA-Fragmente wandern lediglich in der Gelmitte auf einer geradlinigen Bahn, während zu den Gelrändern hin die Moleküle einen zunehmend bogenförmigen Weg durchlaufen müssen; Abbildung 34 demonstriert dies. Fragmente von gleicher Größe liegen auf einer gekrümmten Kurve. Dies war bei der Größenbestimmung hybridisierender Fragmente zu berücksichtigen.

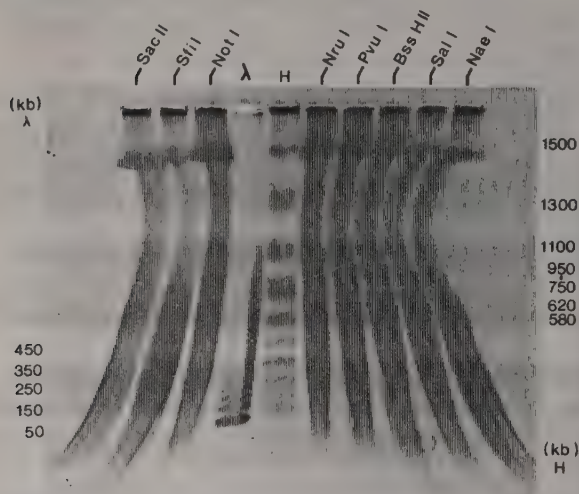


Abb. 34: Auftrennung von PC3-DNA (gespalten mit selten schneidenden Restriktionsenzymen) mit Hilfe der PFG-Elektrophorese

Die Enzyme, die für die Einzelspaltungen eingesetzt worden waren, sind an der Kopfzeile des Gelbildes angegeben. Die Größen der Oligomeren der Phagen-DNA (λ) und der Hefechromosomen-DNA (H) sind in kb angegeben. Das 1,2 %-ige Agarosegel (0,5 x TEB-Puffer) wurde 40 h bei 15°C (Puffer-temperatur) und

einer konstanten Pulszeit von 100 sec bei 300 V betrieben. Die Auflösungsgrenze liegt unter diesen Bedingungen bei etwa 1,5 Mb, wie die Kompressionszone zeigt. Die Wanderungsgeschwindigkeit für Moleküle, die kleiner als 1,5 Mb sind, ist proportional zum Molekulargewicht. (Weitere Einzelheiten zur Durchführung der PFG-Elektrophorese sind unter 4.2.5.2. angegeben.)

Eine neuere Variante der PFG-Elektrophorese, die Feld-Inversions-Gel-Elektrophorese ("FIGE"; Ref. 95) vermeidet diese Verzerrungseffekte. DNA-Moleküle gleicher Größe durchlaufen in glei-

chen Zeiten jeweils die gleich große Distanzen. Ein Beispiel dazu ist in Abb. 35 dargestellt. Da jedoch andere Nachteile (Auflösungsunschärfe im Größenbereich von mehr als 0,5 Mb Größe; geringere Kapazität hinsichtlich der Menge an auftrennbarer DNA pro Spur) im Vergleich zur PFG-Methode festzustellen waren, wurde der PFG-Elektrophorese der Vorzug eingeräumt.

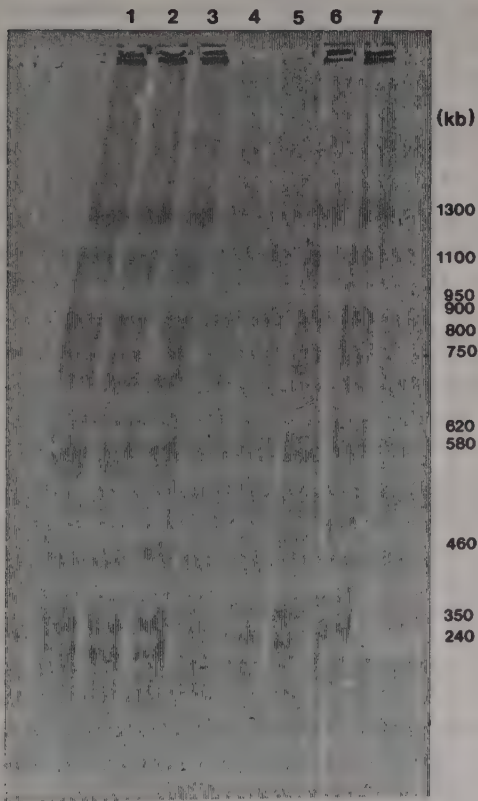


Abb. 35: Auftrennung chromosomaler Hefe-DNA mit Hilfe der Feld-Inversions-Gel-Elektrophorese (FIGE)

(kb) In den Spuren 1 bis 7 handelt es sich um DNA des diploiden Wildtyp-Hefestammes #140 (4.1. 2.). Die Größen der Hefechromosomen sind am Gelrand in kb angegeben. Es handelt sich um ein 1%iges Agarosegel (0,5 x TEB-Puffer). Färbung erfolgte mit Ethidiumbromid. Für die Elektrophorese wurden Schaltintervalle gewählt, die für die Vorwärts-Laufrichtung "V" linear von 9 sec zum Zeitpunkt $t=0$ auf 60 sec zum Zeitpunkt $t=16$ h anstiegen. Für die Intervalle für die Rückwärts-Laufrichtung "R" galt: $t=0$: 3 sec; $t=16$ h: 20 sec. Dadurch war ein konstantes Verhältnis von 3:1 zwischen V und R gegeben. Die Steuerung der Elektrophorese erfolgte über einen Apple IIe-Computer. Das angefertigte Rechenprogramm ist unter 4.2.12. aufgelistet.

2.6.3. Untersuchungen zur Strukturanalyse des V_K -Locus und Bestimmung des Maximalabstandes: V_K -Gene - C_K -Locus

2.6.3.1. Abschätzung der Größe des V_K -Locus

Die Mitglieder der V_K -Genfamilie des Menschen sind, abgesehen von einigen Ausnahmen (56, 69), auf dem kurzen Arm von Chromosom 2, in der Nähe des Centromers (2 cen $\rightarrow$ p12) lokalisiert (10). Die Größe des V_K -Locus war nicht bekannt. Mit Hilfe der Methode der PFG-Elektrophorese wurde versucht, eine ungefähre Größenbestimmung des Genlocus' der V_K -Multigenfamilie vorzunehmen.

Zwei V_K -Genproben, die einen großen Anteil der bisher bekannten V_K -Gene erkennen, nämlich die Subgruppe I-Probe m1-3 (66) und diejenige der Subgruppe II, m607V-3 (31), wurden als Hybridisierungsproben eingesetzt. Für die Region des Subgruppe IV-Gens, welches mit großer Wahrscheinlichkeit nur in einer Kopie im Humangenom vorliegt (75, 76), waren die Strukturdaten durch Hybridisierung mit Hilfe des für diese Region (Region B; Ref. 67) spezifischen Klon m11-7 (Ref. 67, Tab. 9) bereits ermittelt worden (vorl. Arbeit; 2.6.3.; Tab.8). Da die V_K -Gene in gemischter Abfolge im Genom vorliegen (33, 34, 79, vorl. Arbeit), konnte auf den Einsatz von Subgruppe III-Proben verzichtet werden (s. 2.6.2.1.).

Bei der Größenabschätzung des V_K -Locus' wurde davon ausgegangen, daß die V-Gene im V_K -Locus in relativ gleichmäßiger Abfolge vorliegen. In den bisher untersuchten V_K -Regionen (33, 34, 57, 65, 68, vorl. Arbeit) sind die V-Gene durch relativ kurze Abstände voneinander getrennt (1-15 kb). Mit Ausnahme der W-Regionen (34, 65) findet man in den terminalen Bereichen der bisher charakterisierten Regionen V_K -Gene, sodaß man von einer Fortsetzung dieser gleichmäßigen V_K -Genverteilung ausgehen kann. Die bisher bekannten Regionen sollten durch Bereiche mit V_K -Genen verbunden sein. Kopplungsuntersuchungen der verschiedenen V_K -Regionen (2.6.3.2.) zeigten schließlich, daß die verschiedenen Regionen relativ nahe benachbart sein müssen. Ein sehr ausgeprägter "Inselcharakter" der einzelnen Regionen ist eher unwahrscheinlich.

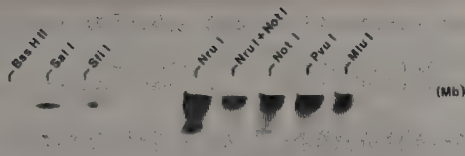


Abb. 36: Hybridisierung gespaltener, hochmolekularer DNA mit einer V_K -Probe der Subgruppe I

Nach PFG-Elektrophorese (Pulszeit 100 sec) wurden die DNA-Fragmente auf Nitrozellulose transferiert und mit der Probe m1-3 (66) hybridisiert (0,5 x SSC, 68 °C im letzten Waschschrift). Es handelte sich mit einer Ausnahme (NotI + NruI) um Einzelspaltungen. Die Größen der hybridisierenden Fragmente

sind in Tab. 8 zusammengestellt. Als Größenmarker wurden Oligomere der DNA des Phagen λ und chromosomale Hefe-DNA (4.1.2.) verwendet. Die entsprechenden Größen der Marker-DNA sind in Mb angeführt.

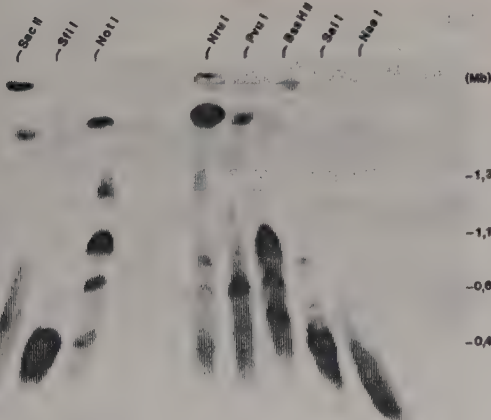


Abb. 37: Hybridisierung gespaltener, hochmolekularer DNA mit einer V_K -Probe der Subgruppe II

Gespaltene DNA (Einzelspaltungen) wurde bei einer Pulszeit von 100 sec mit Hilfe der PFG-Elektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit der Probe m607V-3 (31; Subgruppe II) hybridisiert (0,5 x SSC, 68°C im letzten Waschschrift). Die Größen der hybridisierenden Fragmente sind in Tab. 8 zusammengefaßt.

Im Falle der NaeI- und SacII-Spaltungen konnten dem Autoradiogramm keine verwertbaren Hybridisierungsdaten entnommen werden. Die Größen der Marker (chromosomale Hefe-DNA, Oligomere der DNA des Phagen λ) sind in Mb angegeben.

Tabelle 8: Zusammenstellung aller Hybridisierungsdaten, die bei
rese gewonnen wurden (Text zur Tabelle: S. 120)

Spal- tung	pC-2 (C _K)	m142-1 m163-1 (Aa, Ab)	m111-7 (B)	m21-1 (La, Lb)	m143-1 (0a,0b)	m217-1 (0b)
NotI	1.300 (1.200)	≥ 1.300 1.000	1.300 (1.200)	1.300 1.000	≥ 1.300 1.000	$\geq (1.500)$ (1.250) 900
BssHII	(1.300) 1.000 600	-	(1.300) 1.000 600	1.100 1.000 (600)	-	1.100 1.000
PvuI	1.500	-	1.300	*	-	(1.500) (1.200) (700) 500
SalI	500	(500) 200	600	*	1.100 250 50	800 250
ClaI	200	200	100	-	300 200	50
SfiI	500	100	500	550 500 350	250 200	100
XhoI	150	200	100	*	50	50
NruI	*	≥ 1.300	*	≥ 1.500	≥ 1.300	≥ 1.500
MluI	*	-	*	-	-	$\geq (1.500)$ (400)
SacII	*	-	*	*	-	-

der Untersuchung des K-Locus' unter Einsatz der PFG-Elektropho-

m167-1	m1-3	m607V-3	Leu2A	Leu2B	m119-2	m115-20	m218-3
(Wa,Wb)	(V _K I)	(V _K II)	(Leu2/T8)		(Chr22)	(Chr1)	(Z-) (Fam.)
≥ (1.200)	1.300	≥ 1.500	≥ (1.500)	≥ (1.500)	*	≥ 1.500	≥ 1.300
600	1.100	1.300	450	450		1.100	900
400	(800,650,	1.100				650	200
250	450,400)	700					
		(450,350)					
W (1.500)	(1.200)	(1.250)	*	300	250	-	-
(900)	(1.100)	1.100					
500	1.000	1.000					
	900	750,600					
W 1.500	1.400	≥ 1.500	≥ (1.500)	*	1.400	(1.000)	600
(1.100)	(1.200)	(1.100)	1.200			700	
	650	600,650				400	
900	(1.100)	(900)	950	950	400	(1.300)	650
600	950,800	(600)				(1.100)	500
(450,400	(620,580)	400				(1.000)	450
250,200)	480,390,					950,900,	
	280,150					650,600	
(500)	-	-	200	-	150	900,650,	(300)
(450)						450	(250)
150						(400)	200
100	(650,600,	(650)	300	10	500	350	500
	550)	450,400				300	400
	430,350	300					
(200)	*	-	*	-	10	-	200
100							150
50							50
≥ 1.400	*	≥ 1.500	650	600	*	≥ 1.500	*
(700)		(1.300)				1.000	
		(1.250)				850,650,	
		950,600				600	
*	1.250	-	-	-	*	≥ 1.500	*
	1.000						
	650,450						
-	*	≥ 1.500	*	*	*	500	*
		(1.000)				300	
		(600)					

Tab. 8: Die Größen der hybridisierenden Fragmente sind in kb angegeben, wobei sehr schwach hybridisierende Fragmente durch Einklammerung gekennzeichnet sind. (Sehr schwache Banden sind wahrscheinlich auf unvollständige Spaltung oder Partialspaltung zurückzuführen.) Ein Minuszeichen sagt aus, daß die entsprechende Spaltung nicht durchgeführt wurde, ein Sternsymbol, daß die zugehörigen Daten nicht auswertbar waren (zu große Fragmente, unscharfe oder zu wenig intensive Hybridisierungsbanden). Bei Spaltungen mit SmaI und NaeI waren relativ kleine, hybridisierende Fragmente (kleiner 100 kb) bei verschiedenen Versuchen erhalten worden. Diese Daten wurden nicht in die Tabelle aufgenommen. Angaben zu den eingesetzten Hybridisierungsproben sind unter Tab. 9 und 10 zu finden. Die Hybridisierungen wurden unter stringenten Bedingungen (0,5 x SSC, 68°C im letzten Waschschrift) durchgeführt. Die Pulszeiten der PFG-Elektrophoresen lagen zwischen 70 und 140 Sekunden.

Die Vorgehensweise zur ungefähren Größenbestimmung des Umfangs des V_K -Locus' war folgende: PC3-DNA wurde verschiedenen Einzelspaltungen unterworfen (BssHII, MluI, NotI, NruI, PvuI, SalI, SfiI), die Fragmentgemische nach der PFG-Elektrophorese auf Nitrozellulose transferiert und anschließend mit den Proben der Subgruppe I und II hybridisiert. Die Hybridisierungsdaten sind in Tab. 8 zusammengefaßt, die entsprechenden Autoradiogramme in den Abbildungen 36 und 37 dargestellt. Im Falle der Subgruppe I wurde aus den Summen der hybridisierenden Fragmente (MluI, NotI, PvuI, SalI, SfiI) unter Berücksichtigung der Daten für die B-Region ein Mittelwert für die Größe des V_K -Locus' von 3,5 Mb berechnet. Für die Hybridisierung mit der Probe der Subgruppe II wurde aus den Daten der NotI-, PvuI-, SalI- und SfiI-Spaltungen (+ B-Region) ein mittlerer Wert von 3,3 Mb bestimmt. (Die BssHII- und NruI-Daten wurden hierbei nicht berücksichtigt.) Man kann in erster Näherung davon ausgehen, daß die V_K -Multigenfamilie verstreut auf einen Bereich von 3-4 Mb auf Chromosom 2 vorliegt.

2.6.3.2. Kopplungsuntersuchungen an V_K -Regionen

In der Arbeitsgruppe von Prof. Zachau wurden durch Cosmidklonierung eine Reihe von V_K -Genen strukturell analysiert (107). Die V_K -Gensegmente liegen auf bisher charakterisierten Bereichen von

100 bis 200 kb Größe. Diese Bereiche tragen bis zu 15 V_K -Gene. Es handelt sich im einzelnen um die A-Regionen Aa und Ab (vorl. Arbeit, 67), die L-Regionen La und Lb (32, 33, 57), die O-Regionen Oa und Ob (34, 68), die W-Regionen Wa und Wb (34, 65) und die B-Region (65, 67). Diese V_K -Regionen liegen mit Sicherheit auf Chromosom 2, wie E. Lötscher zeigen konnte (69). Die Regionen A, L und W existieren in jeweils zwei sehr homologen, nichtallelischen Kopien (33, 34, vorl. Arbeit). Für die O-Regionen Oa und Ob gibt es eine Reihe von Hinweisen, die auch in diesem Fall auf eine Duplikation schließen lassen (34, 68). Mit Proben, die spezifisch für die einzelnen Regionen sind, konnte unter Einsatz der PFG-Elektrophorese eine Kopplungsanalyse der verschiedenen Bereiche vorgenommen werden.

Die verschiedenen Regionen konnten auf folgende Art und Weise strukturell miteinander in Beziehung gesetzt werden: PC3-DNA wurde mit selten schneidenden Restriktionsnukleasen Einzelspaltungen unterworfen. Mit Hilfe der PFG-Elektrophorese wurden die hochmolekularen DNA-Fragmente aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferriert und mit spezifischen Proben aus den einzelnen Regionen hybridisiert. Regionen, die im V_K -Locus benachbart zueinander vorliegen, sollten mit großer Wahrscheinlichkeit auf hybridisierenden Fragmenten derselben Größe zu finden sein. Die verwendeten Subklone sind in Tab. 9 zusammengestellt. Die Proben aus den duplizierten Regionen erkennen jeweils beide V_K -Regionen. Diskriminierende Proben stehen bisher noch nicht zur Verfügung. Aus diesem Grund konnten bei dieser Analyse Aa und Ab, La und Lb, Oa und Ob, Wa und Wb nicht unterschieden werden. Daher ist im folgenden lediglich von "der einen" oder "der anderen" Kopie der Regionen A, L, O und W die Rede.

Das Ergebnis der Kopplungsanalyse ist in Abb. 38 schematisch dargestellt. Es wurde gefunden, daß je eine Kopie der A, L und O-Regionen in Nachbarschaft zueinander vorliegen. In NotI-gespaltener DNA erkannten die Proben der A-, L- und O-Regionen jeweils zwei Fragmente von 1,0 und 1,3 Mb Größe (Abb. 39a). Für die B-Region, die nicht dupliziert vorliegt, wurde in NotI-gespaltener DNA ein hybridisierendes Fragment von 1,3 Mb Größe gefunden. (Dies weist auch daraufhin, daß die zwei hybridisierenden Frag-

Tabelle 9: Hybridisierungsproben, die für die Kopplungsanalysen verschiedener Regionen des V_K -Locus eingesetzt wurden

Region	Probe	Zitat
Aa, Ab	m163-1 m142-2	vorl. Arbeit - " -
B	m111-7	67
La, Lb	m21-1	33
Oa, Ob	m143-1 m217-1	34 34
Wa, Wb	m167-1	34
C_K	pC-2	175'
"Chr 1"	m115-20	69
"Chr 22"	m119-2	63, 64
Z-Familie	m218-3	65

Einzelheiten zu den eingesetzten Proben sind aus den angegebenen Veröffentlichungen oder der vorliegenden Arbeit zu entnehmen. Der Klon m111-7 ist nicht veröffentlicht. Dieser wurde von W. Lorenz, einem Mitglied der Arbeitsgruppe, konstruiert. Es handelt sich bei dem Klon um ein 0,6 kb HindIII-Fragment aus cos 111 (Region B), welches im M13-Phagenvektor mp 10 vorliegt. Die klonierte Sequenz existiert in nur einer Kopie im Humangenom (67).

Für die Hybridisierungen wurden die Proben von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden in hochligierter Form eingesetzt, d.h. die klonierten Sequenzen der jeweiligen Klone waren isoliert und zu Multimeren ligiert worden. Diese radioaktiv markierten Proben ergaben besonders intensive Signale (169).

mente im Falle der A-, L- und O-Regionen nicht auf Partialspaltungen zurückzuführen sind, sondern im Einklang mit der Duplikation dieser Regionen stehen.) Die einfachste Erklärung der Daten wäre, daß die B-Region zusammen mit einer Kopie der A-, L- und

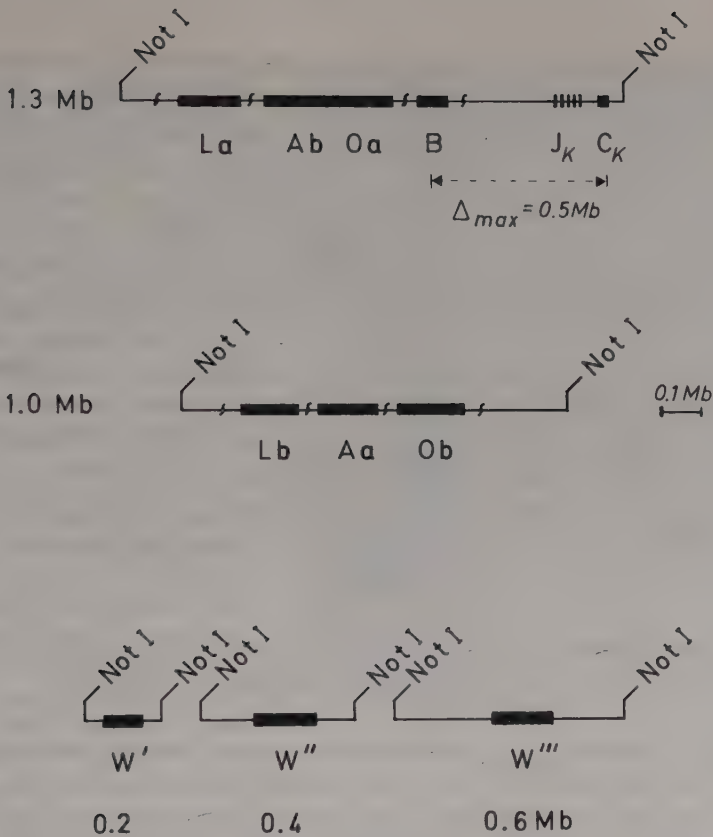


Abb. 38: Schematische Darstellung der Ergebnisse der Kopplungsanalysen verschiedener V_K -Regionen mit Hilfe der PFG-Elektrophorese: Grobkartierung des V_K -Locus

Dargestellt sind die verschiedenen V_K -Regionen, die auf bestimmten NotI-Fragmenten in Gruppen zusammengefasst oder zumindest lokalisiert werden konnten. Je eine Kopie der A-, L- und O-Region konnte auf einem 1,0 Mb Fragment, die jeweils andere Kopie dieser Regionen, weiterhin die B-Region und die C_K-Region auf einem 1,3 Mb NotI-Fragment lokalisiert werden. (Die Zuordnung der einzelnen, duplizierten Regionen zu den beiden NotI-Fragmenten geht auf weiterführende Untersuchungen von W. Lorenz, Ref. 67, zurück. Die Regionen Ab und Oa konnten kürzlich von W. Lorenz (67) und W. Pargent (68) durch "chromosomal walking" verbunden werden.) Die kleinen, geschwungenen Linien symbolisieren, daß die Abstände der verschiedenen Regionen zueinander nicht bekannt sind, und daß die verschiedenen Regionen auch in einer anderen, relativen Abfolge vorliegen könnten. Die W-Regionen wurden mit W', W'' und W''' bezeichnet. Der gestrichelte Pfeil weist darauf hin, daß die Distanz zwischen der B- und der C_K-Region maximal 500 kb beträgt.

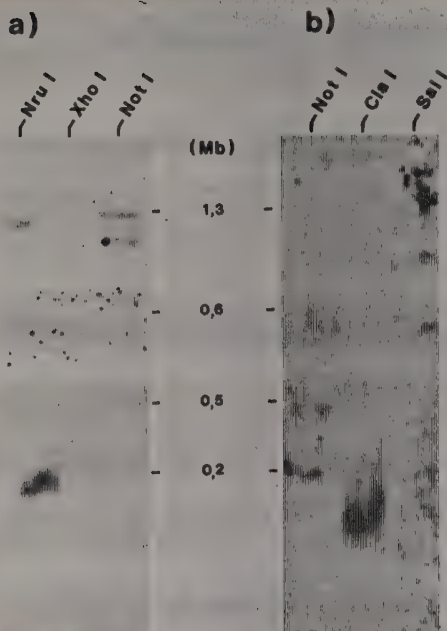


Abb. 39: Hybridisierung gespaltenen, hochmolekularer DNA nach PFG-Elektrophorese mit Proben die spezifisch für die A-, bzw. W-Regionen sind

In Abb. 39 a ist die Hybridisierung von NruI-, XhoI- und NotI-gespaltenen PC3-DNA mit dem Klon ml63-1, der aus Region Aa stammt und auch Region Aa erkennt (2.4., Tab. 5), dargestellt. Die Pulszeit bei der PFG-Elektrophorese betrug 40 Sekunden. Der letzte Waschschrift nach der Hybridisierung erfolgte bei 0,5 x SSC und 68°C. Die hybridisierenden NotI-Fragmente haben eine Größe von 1,0 und 1,3 Mb. Die Größe des hybridisierenden XhoI-Fragmentes ist aufgrund von Cosmid-kartierungen bekannt (Abb. 16 und 20, 2.4.) und beträgt (für Aa und

Ab gleichermaßen) 16 kb. Größenmarker sind am Rand des Autoradiogrammes in Mb angegeben.

Bei Abb. 39 b handelt es sich um die Hybridisierung von gespaltenen PC3-DNA mit dem Klon ml67-1 (34), der spezifisch für die W-Regionen ist (34). Die Pulszeit der PFG-Elektrophorese und die Waschbedingungen nach der Hybridisierung entsprechen denjenigen, die in Abb. 39a angegeben sind. Die Größen der hybridisierenden Fragmente sind in Tab. 8 angegeben, bzw. können mit Hilfe des Größenmarkers direkt aus der Abbildung entnommen werden.

O-Regionen auf dem 1,3 Mb NotI-Fragment vorliegt, während auf dem 1,0 Mb Fragment die anderen Kopien der duplizierten Regionen lokalisiert werden können.

Die Kopien der W-Regionen konnten in keinerlei strukturellen Zusammenhang zur Gruppierung der eben erwähnten Regionen gebracht werden. Im Falle von NotI-gespaltenen DNA findet man drei hybridisierende Fragmente von 250, 400 und 600 kb Länge (Abb. 39b). Für SallI-gespaltenen DNA konnten neben zwei deutlichen Hybridisie-

rungsbanden bei 600 und 900 kb noch vier kleine Fragmente (200 - 450 kb) nachgewiesen werden (Abb. 39b). Sollte bei SalI tatsächlich eine Partialspaltung vorliegen, so kann man dennoch aufgrund der Daten aus der NotI-Spaltung annehmen, daß die W-Regionen in mehr als nur zwei Kopien auf Chromosom 2 vorkommen.

Die Daten, die bei den übrigen Einzelspaltungen (Tab. 8) nach Hybridisierung erhalten worden waren, erlaubten keine detailliertere Kopplung einzelner Regionen. Entweder waren zu kleine Fragmente entstanden (ClaI, SfiI, XhoI), als daß eine Verknüpfung von einzelnen Bereichen möglich gewesen wäre oder es lagen hybridisierende Fragmente vor, die jenseits der Auflösungsgrenze des PFG-Elektrophoresesystems waren (NruI, PvuI). Lediglich die Daten der BssHII-Spaltungen deuten darauf hin, daß jeweils eine Kopie der L-Regionen eng gekoppelt mit einer Kopie der O-Regionen vorliegt (hybridisierende Fragmente von 1,0 und 1,1 Mb Länge).

2.6.3.3. Die Distanz zwischen dem C_K -Locus und den V_K -Genen der B-Region beträgt maximal 500 kb

Im Zuge der Bildung kompletter Gene für die leichten Proteinketten vom K-Typ der Immunglobuline erfolgt eine Umlagerung von V_K -Gensegmenten an ein J_K -, bzw. das C_K -Gensegment (6 - 8). Da über den Mindestabstand zwischen V_K -Gensegmenten und dem C_K -Locus nichts bekannt war, konnte bisher keine Aussage darüber getroffen werden, innerhalb welcher (Mindest-)Größenbereiche sich die Umlagerung von V/C-Gensegmenten abspielt. Die PFG-Elektrophorese erlaubte erstmals die Bestimmung des Abstandes zwischen den V_K -Genen der B-Region und dem C_K -Locus.

Wie den Daten aus Tab. 8 und den beiden Autoradiogrammen (Abb. 40a und 40b; Proben s. Tab. 9) zu entnehmen ist, sind die beiden Genloci relativ eng benachbart (Maximalabstand = 500 kb). Im Falle der NotI-Spaltung findet man in beiden Fällen ein hybridisierendes Fragment von 1,3 Mb Größe. Da die hybridisierenden Fragmente der SalI- und SfiI-Spaltungen sowohl für die B-Region als auch für die C_K -Region dieselben Größen aufweisen (500 kb), kann die Distanz zwischen beiden Genloci nicht mehr als 0,5 Mb

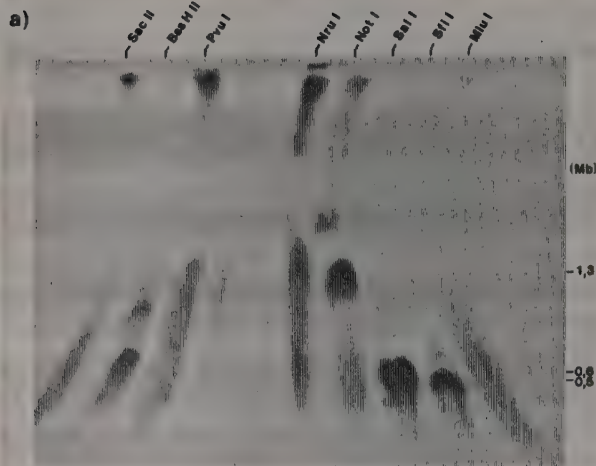
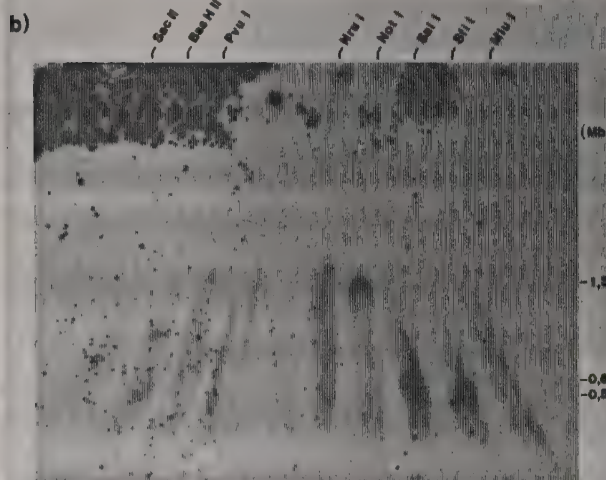


Abb. 40: Vergleich zweier Autoradiogramme; Hybridisierung gespaltener, hochmolekularer DNA mit spezifischen Klonen aus der B- und C_κ-Region

Abb. 40 a zeigt das Autoradiogramm der Hybridisierung von gespaltener PC3-DNA mit dem Klon mJlul-16 (75) aus der C_κ-Region. Die Pulszeit bei der PFG-Elektrophorese hatte 140 Sekunden betragen. Der letzte Waschschritt war bei 0,5 x SSC und 68°C erfolgt. Die Größen der hybridisierenden

Banden sind Tab. 8 zu entnehmen. Auf die Größen der hybridisierenden NotI-, SalI- und SfiI-Fragmente ist am Bildrand (in Mb) hingewiesen. Die SacII-, PvuI- und NruI-Spaltungen lieferten keinerlei verwertbare Daten. Im Falle von BssHII ist ein Bandentriplett zu sehen (Partialsplaltung). Für NotI liegt eine zu vernachlässigende Partialsplaltung vor.



In Abb. 40 b ist das Autoradiogramm der Hybridisierung von gespaltener PC3-DNA mit dem spezifischen Klon aus der B-Region, mlll-7 (67; Tab.9), dargestellt. Pulszeit und Waschbedingungen waren ebenso gewählt wie für den Versuch mit der C_κ-Probe. Das Bandentriplett der BssHII-Splaltung ist ebenfalls gegeben. Die Größen der hybridisierenden Fragmente sind in Tab. 8 angegeben. Auf die Größen der hybridisierenden NotI-, SalI- und SfiI-Fragmente ist speziell hingewiesen (Mb). Die SacII- und NruI-Spaltungen hatten keinerlei verwertbare Daten ergeben.

betragen. Abgesehen von diesen drei Übereinstimmungen beweisen insbesondere die Daten der BssHII-Spaltung eine enge Kopplung beider Loci: In beiden Fällen (Abb. 40, Tab. 8) findet man bei Hybridisierung mit den spezifischen Suchproben (Tab. 9) dasselbe Bandentriplett (0,6/1,0/1,3 Mb). Dies zeigt einerseits, daß Partialspaltungen vorliegen (BssHII reagiert im Gegensatz zu den anderen eingesetzten Enzymen empfindlich auf die Methylierung der Erkennungssequenzen.) Andererseits beweist gerade ein identisches Partialspaltungs-Muster eindeutig die Kopplung dieser beiden Genloci.

Die V_K -Gene je einer Kopie der A-, L- und O-Regionen sind ebenfalls in relativer Nachbarschaft zum C_K -Locus gelegen. Das 1,3 Mb NotI-Fragment, auf welchem Kopien dieser Regionen lokalisiert wurden (2.6.3.1.), wird ebenfalls von dem Suchklon aus dem Bereich der C_K -Region erkannt (Tab. 8).

2.6.4. Ist das Leu2/T8-Gen im Bereich des bisher analysierten V_K -Locus' zu lokalisieren ?

Innerhalb der großen Familie der gesamten Immunglobulingene steht das singuläre Leu2/T8-Gen hinsichtlich seiner Nukleinsäuresequenz und dem Strukturaufbau des Proteins den V-Gensegmentfamilien (V_H , V_K , V_λ) relativ nahe (108, 109). Das entsprechende Genprodukt tritt als Membranprotein bei einer bestimmten Untergruppe von T-Zellen (T-Helfer-Zellen) auf und wird für die Wechselwirkung dieser T-Lymphozyten mit Zellen, die Histokompatibilitäts-Antigene (MHC) der Klasse II tragen, verantwortlich gemacht (110).

Dieses Gens wurde auf dem kurzen Arm von Chromosom 2, in der Nähe des C_K -Locus' lokalisiert (111) und liegt somit in der Umgebung der V_K -Multigenfamilie (10). Es wurde daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht, ob eine enge Kopplung dieses Gens zu bisher charakterisierten V_K -Regionen vorliegt. Bei dieser Untersuchung wurde in zwei Stufen vorgegangen:

- Die bisher analysierten V_K -Gene (33, 34, 56, 57, 67, 68, vorl. Arbeit) liegen auf charakterisierten Bereichen von 100-200 kb Größe und machen zusammen etwa 1,2 Mb aus (56). Etwa 900 kb liegen auf Chromosom 2, die übrigen Bereiche sind auf andere Chromosomen verstreut (56, 69). Ausgewählte Cosmide, die alle bis zu diesem Zeitpunkt analysierten Regionen (A-, L-, O-, W-Regionen; Z-Familie; Chr 1, 5, 22; cos 138; C_K -Bereich) repräsentierten, wurden mit dem Enzym BglII gespalten, die DNA-Fragmente nach Elektrophorese auf Nitrozellulose transferiert und mit zwei spezifischen Subklonen aus dem 5'- und 3'-Flankenbereich des Leu2/T8-Gens ("Leu 2A" und "Leu2B") hybridisiert. (Diese Subklone waren freundlicherweise von Dr. J.R. Parnes, Stanford, zur Verfügung gestellt worden. Weitere Einzelheiten bezüglich der beiden Klone sind unter 4.1.4. angegeben.) Keines der Cosmide ergab ein Hybridisierungssignal mit einer der beiden Proben (2 x SSC, 68°C im letzten Waschschrift). Eine sehr enge Kopplung des Gens Leu2/T8 an bisher charakterisierte V_K -Regionen konnte somit ausgeschlossen werden.

- Eine Kopplung des Leu2/T8-Gens an V_K -Regionen über eine größere Distanz erschien möglich. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe der PFG-Methode untersucht, ob eine Nachbarschaft zu Regionen des V_K -Locus vorliegt. Die mit den Proben "Leu2A" und "Leu2B" (4.1.4.) erhaltenen Hybridisierungsdaten sind in Tab. 8 angegeben. Da keine Korrelation zu den Daten der V_K -Regionen gefunden werden konnte, ist eine enge Kopplung dieses Gens an den Ort der V_K -Multigenfamilie als unwahrscheinlich anzusehen.

2.6.5. Strukturuntersuchungen an translozierten V_K -Genregionen

Im Gegensatz zu den meisten V_K -Genen, die auf Chromosom 2 lokalisiert sind (10, 69), sind einige V_K -Gene auf verschiedene Chromosomen transloziert (56). Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit (2.3.) eine Gruppe von V_K -Genen, die "Z-Familie", charakterisiert,

die mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls verstreut im Genom vorliegt. Für diese translozierten Regionen wurden mit Hilfe der PFG-Elektrophorese einige ergänzende Versuche durchgeführt:

- Die mit "Chr 22" bezeichnete, translozierte V_K -Region trägt fünf eng benachbarte V_K -Gene (56, 63, 64, 65). Ein Subklon aus dieser Region, ml19-2 (63), hatte bei Hybridisierung mit DNAs aus Zellhybriden neben dem eindeutigen Hinweis auf die Translozierung der Region auf Chromosom 2 (56) auch ein schwaches Signal für Chromosom 2 ergeben (64). Wenn die Translozierung über einen Genkonversions-ähnlichen Mechanismus abgelaufen ist, so wäre es denkbar, daß eine divergente "Urkopie" von "Chr 22" auf Chromosom 2 existiert. Sollte diese im Bereich des V_K -Locus liegen, würde man möglicherweise eine Kopplung an die bisher charakterisierten Regionen mit Hilfe der PFG-Elektrophorese nachweisen können. Die Hybridisierungsdaten (Klon ml19-2: Ref. 63, 64) sind in Tab. 8 angegeben. Diese lassen keine Korrelation mit denjenigen der V_K -Regionen von Chromosom 2 zu. Weiterhin findet man bei den verschiedenen Einzelspaltungen jeweils nur ein hybridisierendes Fragment. Hinweise auf eine Ursprungskopie von "Chr 22" konnten somit nicht gefunden werden.

- Ein auf Chromosom 1 transloziertes V_K -Gen (56) wird durch mehrere, nämlich sechs Cosmide dargestellt (55). Diese können nach Spaltstellenunterschieden wiederum in zwei Untergruppen - vertreten durch ein, bzw. fünf Cosmide - eingeteilt werden (55). Abgesehen von der Möglichkeit, daß es sich lediglich um allelische Varianten handelt, wäre es auch denkbar, daß dieses V_K -Gen mit großen Flankenbereichen in mehreren Kopien auf Chromosom 1 transloziert vorliegt. Mit dem für diese Region spezifischen Klon ml15-20 (69) wurde gespaltene PC3-DNA hybridisiert. Die in Tab. 8 angegebenen Daten weisen darauf hin, daß diese Region (oder zumindest der Bereich des Subklons ml15-20) tatsächlich in mehreren Kopien auf diesem Chromosom vorliegen könnte: Für mehrere Spaltungen wurde jeweils eine Reihe von hybridisierenden Banden, für

SalI-gespaltene DNA sogar sieben, gefunden. Es könnte sich um eine intrachromosomale Amplifikation dieser tranlozierten V_K -Region handeln.

- Im Rahmen dieser Arbeit war die "Z-Familie" charakterisiert worden (2.3.). Diese Familie liegt in vier ähnlichen Kopien vor (Z1-Z4) und ist wahrscheinlich über verschiedene Chromosomen verstreut (2.3.). Sollten jedoch Mitglieder der Z-Familie im V_K -Locus liegen, so könnte man eine Kopplung dieser Genregionen an die A-, L-, O- oder W-Regionen erwarten. Für die Hybridisierung war der Klon m218-3 verwendet worden, der von F.-J. Zimmer (65) hergestellt worden war. Es handelt sich um ein 1,1 kb BamHI-Fragment aus cos 218, welches in den M13-Vektor mp10 kloniert ist. Dieser Klon erkennt Z1 - Z4 (65).

Eine Korrelation zu V_K -Regionen auf Chromosom 2 (beispielsweise mit dem 1,0 oder 1,3 Mb NotI-Fragment der verschiedenen V_K -Regionen) war nicht gegeben. Eine nahe Nachbarschaft zu den Genen des V_K -Locus ist somit sehr unwahrscheinlich; vielmehr stehen diese Ergebnisse in Übereinstimmung mit den anderen Hinweisen (2.3.), die eine Translozierung der Z-Familie vermuten lassen.

2.7. Transkriptions- und Strukturuntersuchungen an den, V_K I-Genen benachbarten, L-Sequenzen

Im Zuge der Strukturanalyse der V_K -Genfamilie des Menschen war eine neue, niedrigrepetitive Sequenzfamilie, die sog. "L-Sequenzen", analysiert worden (78). Die entsprechende Consensus-Sequenz umfaßt etwa 500 bp. Mitglieder dieser Sequenzfamilie kommen in Nachbarschaft (3'-Flankenbereich) einiger V_K -Gene der Subgruppe I vor (32, 78). Allerdings findet man L-Sequenzen auch in isolierter Form, d. h. ohne Kopplung an V_K -Gene, im Genom (78). Die Kopienzahl dieser Familie wurde auf mindestens 100 geschätzt (78).

Aufgrund der Tatsache, daß L-Sequenzen auffällig häufig in Kombination mit V_K -Genen gefunden werden, wurde überprüft, ob ein regulatorischer Einfluß auf die benachbarten V_K -Gene nachweisbar ist. Zur Klärung dieser Frage wurde die Transkriptionsaktivität der L-Sequenzen untersucht. (Bei dieser Analyse in der vorliegenden Arbeit handelte es sich um Versuche, die in Ergänzung zur früheren Bearbeitung der L-Sequenzen (Diplomarbeit) durchgeführt wurden.)

2.7.1. Die L-Sequenzen werden in Prae-B-Zellen und in der nicht-lymphoiden Zelllinie (HeLa) nicht transkribiert

Um eine eventuelle Transkription von L-Sequenzen nachprüfen zu können, wurde Gesamt-RNA aus den beiden Humanzelllinien NALM-1 (112) und Walker (4.1.3.) isoliert. Erstere stellt den Differenzierungsstatus von Prae-B-Zellen, letztere denjenigen von ausgereiften B-Lymphozyten dar, sodaß zwei verschiedene Entwicklungsstufen von B-Zellen untersucht werden konnten. Zum Vergleich wurde aus einer nichtlymphoiden Zelllinie, nämlich aus HeLa-Zellen (113) RNA isoliert. (In Abb. 41 ist ein Beispiel der verschiedenen Gesamt-RNA-Präparationen dargestellt.)

Die RNAs wurden nach elektrophoretischer Auftrennung und dem Transfer auf Nitrozellulosefilter mit dem L-Sequenz-spezifischen Klon 20-16 (78) unter nicht-stringenten Bedingungen hybridisiert (2 x SSC, 68°C im letzten Waschschrift). Bei mehrfacher Wieder-

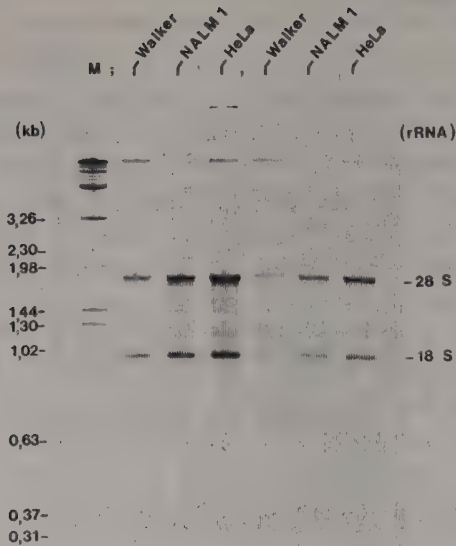


Abb. 41: Isolierung von Gesamt-RNA aus verschiedenen Zelllinien

20, bzw. 10 µg Gesamt-RNA, die nach Ref. 157 aus den Zelllinien isoliert worden waren, wurden auf 1,2%-igen Agarosegelen aufgetrennt (10mM Natriumphosphat - Puffer, pH 7,0). Die Anfärbung des Gels erfolgte mit Ethidiumbromid. Als Größenmarker (M) wurde DNA des Phagen λ eingesetzt, die mit EcoRI und HindIII gespalten worden war. Die Bandengrößen sind am Gelrand in kb vermerkt. Die Positionen der ribosomalen RNA von 18 S und 28 S Größe sind ebenfalls angegeben.

holung des Experimentes wurden keinerlei Hybridisierungssignale erhalten. Eine intensive Transkription der L-Sequenzen, bzw. eine funktionelle Bedeutung im Hinblick auf einen möglichen regulatorischen Einfluß dieser Sequenzen auf V_K -Gene ist demzufolge sehr unwahrscheinlich. Dieses Ergebnis ist vielmehr im Einklang mit der Vorstellung, daß im Laufe der Amplifikation der L-Sequenzen entweder ein Mitglied der normalerweise isoliert vorliegenden L-Sequenzen durch ein Transpositionseignis zufällig in den Flankenbereich eines V_K -Gens gebracht worden war und dann im Laufe der Evolution dieser Genfamilie mitamplifiziert worden ist (78). Dies würde erklären, weshalb diese Sequenz bei Kopplung an V_K -Gene nur mit einem bestimmten Typ an V_K -Genen, nämlich V_{KI} -Genen der L-Regionen, vergesellschaftet vorkommt (32). Weiterhin ist auch denkbar, daß die L-Sequenz ursprünglich nur im 3'-Flanken-

bereich der V_K I-Gene der L-Regionen vorlag und irgendwann, nach Translozierung einer solchen 3'-Flanke, unabhängig amplifiziert worden ist.

Bei der Kombination der L-Sequenzen mit V_K I-Genen handelt es sich also mit großer Wahrscheinlichkeit um eine rein strukturelle Beziehung, nicht aber um einen funktionellen Zusammenhang.

2.7.2. Die Mitglieder der L-Sequenzfamilie liegen verstreut über das gesamte Humangenom vor

Unter den repetitiven Sequenzen des Humangenoms gibt es Sequenzfamilien, die nur auf bestimmten Chromosomen vorkommen (114). Deren Bedeutung oder Funktion sind unbekannt. Für cytogenetische Zwecke sind Proben dieser repetitiven Sequenzen von großem Interesse, weil mit markierten, derartigen Suchproben die entsprechenden Chromosomen leicht diagnostizierbar sind.

Im Falle der L-Sequenzen bestand die Möglichkeit, daß diese ausschließlich oder zumindest zum großen Teil auf Chromosom 2 zu finden sein könnten. Ein gewisser Anteil der L-Sequenzen liegt nachgewiesenermaßen in Kombination mit V_K -Genen, die auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 lokalisiert wurden (10), vor. Sollte die Amplifikation der L-Sequenzen nach dem oben erwähnten Modell (78) von statten gegangen sein, was zur Entstehung von isolierten L-Sequenzen geführt hat, so wäre denkbar, daß diese Amplifikation auf den Bereich von Chromosom 2 beschränkt geblieben ist.

Die chromosomale Verteilung der L-Sequenzen wurde daher auf folgende Weise untersucht: DNAs aus Hybridzelllinien, die mit EcoRI gespalten und auf Nitrozellulosefilter transferiert worden war, wurde mit dem L-Sequenz-spezifischen Klon 20-16 (78) hybridisiert. Bei den DNAs handelte es sich um Präparationen aus Maus-Mensch- und chines. Hamster-Mensch-Zelllinien (77), die freundlicherweise von K.-H. Grzeschik, Univ. Münster, zur Verfügung gestellt worden waren.

Wie aus dem in Abb. 42 dargestellten Autoradiogramm zu entnehmen ist, weisen nahezu alle Spuren ein ähnliches Hybridisierungsmuster, bestehend aus mehreren Banden, auf. Da eine Kreuzhybridi-

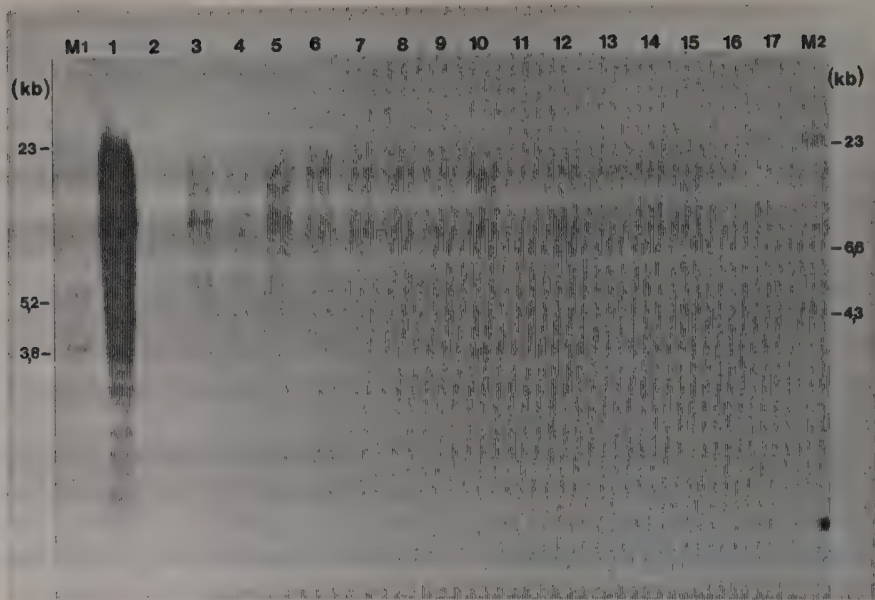


Abb. 42: Versuch der chromosomalen Zuordnung der L-Sequenzen zu einzelnen Chromosomen des Humangenoms

Dargestellt ist die Hybridisierung von DNAs aus Zellhybriden mit dem L-Sequenz-spezifischen Klon 20-16 (78). Die Hybridisierung erfolgte unter stringenten Bedingungen: 0,5 x SSC und 68°C im letzten Waschschrift. Es handelt sich um DNAs (Spuren 1 - 17) aus Maus-Mensch-, bzw. chines. Hamster-Mensch-Zellhybriden (77, 69), die mit EcoRI gespalten, auf einem 0,8%-igen Agarosegel aufgetrennt und auf Biotin-A-Filter transferiert worden waren. (Die Filter waren von K.-H. Grzeschik, Univ. Münster, zur Verfügung gestellt worden.) Spur 1 enthält nur Human-DNA und dient zur positiven Kontrolle. In den Spuren 2 und 11 war keine DNA aufgetragen. Spur 13 (nur Hamster-DNA) und Spur 17 (nur Maus-DNA) dienen ebenfalls als Kontrolle und zeigen keinerlei Signale, da die L-Sequenzen keine Kreuzhybridisierung mit diesen DNAs ergeben. Die mit "M1" gekennzeichnete Spur enthält mit EcoRI gespaltenes, die mit "M2" markierte Bahn mit HindIII gespaltenes DNA des Phagen λ . Die Größen derjenigen Fragmente, die bei Hybridisierung mit M13-Klonen Signale ergeben, sind zu beiden Seiten des Gels angegeben.

sierung der Probe mit Maus- oder Hamster-DNA ausgeschlossen werden kann (Ref. 81; Kontrollen, s. Legende zu Abb. 32), sind alle Hybridisierungssignale auf L-Sequenzen des Humangenoms zurückzu-

führen. Aufgrund der Tatsache, daß in allen Spuren ein komplexes Muster an Banden zu finden war, schied eine chromosomale Zuordnung der L-Sequenzen zu einem bestimmten Chromosom aus. Vielmehr zeigte dieses Ergebnis, daß die L-Sequenzfamilie über eine Reihe von Chromosomen des Humangenoms verstreut vorliegen muß.

3. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Struktur und Organisation der V_K -Multigenfamilie des Menschen unter Anwendung verschiedener Methoden analysiert. Eine translozierte V_K -Genfamilie und insbesondere zwei, durch Duplikation auseinander hervorgegangene V_K -Genregionen, die A-Regionen (Aa und Ab), wurden im Detail untersucht. Nach der Erörterung von Fragen, die methodische Probleme betreffen (3.1 und 3.2), werden die durch Cosmidkartierung, Hybridisierung, "chromosomal walking", Sequenzierung und PFG-Elektrophorese gewonnenen Daten im Hinblick auf die Evolution und Organisation dieser Multigenfamilie diskutiert.

3.1. Strategien zur Strukturanalyse der V_K -Multigenfamilie

Da Multigenfamilien naturgemäß große genomische Bereiche einnehmen, wählt man für deren Strukturanalyse Klonierungssysteme, welche die Handhabung möglichst großer DNA-Fragmente erlauben. Aus diesem Grund wurden der Analyse der V_K -Genfamilie Cosmidgenbanken zugrunde gelegt. Bei ähnlichen Fragestellungen, wie der Untersuchung des Histokompatibilitäts-Locus' der Maus (40) und des Menschen (41), der Größenbestimmung der amplifizierten Genregionen um das Dihydrofolatreduktase-Gen in Methotrexatresistenten Zellen (115) oder auch bei der Analyse des Bithoraxkomplexes von *Drosophila melanogaster* (116) war diese Methode mit großem Erfolg eingesetzt worden. Mit Hilfe von rasterartig sich überlappenden Klonen wurden Bereiche von mehreren hundert kb Größe in ihrer Feinstruktur aufgeklärt.

Bisher konnten in der Arbeitsgruppe von Prof. Zachau mehrere, 100-200 kb große, V_K -Regionen charakterisiert werden (33, 34, 56, 57, 65, 67, 68, vorl. Arbeit). Einige dieser Regionen tragen bis zu 15 V_K -Gensegmente (vorl. Arbeit, 67). Die Cosmide, welche diese Regionen darstellen, konnten durch Einsatz verschiedener, divergenter V_K -Genproben isoliert werden. Diese Proben erkennen wahrscheinlich den größten Teil der V_K -Gensegmente der V_K -Gen-

familie. Mit Hilfe der Technik des "chromosomal walkings" war es möglich, einzelne Regionen gezielt zu extendieren (34, 56, 65, 67, 68, vorl. Arbeit). Auf diese Weise gelang es kürzlich W. Lorenz (67) und W. Pargent (68), eine der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen A-Regionen mit einer der O-Regionen (34, 68) zu verbinden. Dadurch sind auf einer Region von etwa 300 kb Länge 26 Gensegmente verschiedener Subgruppen (I, II, III) charakterisiert worden. Die anderen Blöcke des V_K -Locus' (B-Region; L-, W-Regionen) liegen bisher noch isoliert vor.

Die zuverlässigste, jedoch sehr arbeitsintensive Methode, diese Regionen zu extendieren, stellt das "chromosomal walking" dar. Im günstigsten Fall kann man eine Extension von etwa 40 kb erreichen. Bei der vorliegenden Problemstellung, nämlich benachbarte Regionen zu verbinden, kann die PFG-Elektrophorese (3.2.) ergänzende Hinweise liefern. Eine grobe Abschätzung, welche Regionen benachbart sind und welche Lücken noch zu schließen sind, ist damit möglich (3.2.).

Abgesehen vom Einsatz spezifischer Suchklone zur Extension charakterisierter Bereiche wäre es im Falle der V_K -Genfamilie auch erfolgversprechend, V_K -Genproben einzusetzen, die in ihren DNA-Sequenzen von den bisher analysierten V_K -Proben möglichst stark abweichen. Bisher waren bei der Suche nach Cosmiden mit V_K -Genen in Genbanken Proben der vier bekannten V_K -Subgruppen eingesetzt worden (32, 33, 34, 64, 75, vorl. Arbeit). Sequenzanalysen von J. Stavnezer (24) und im Rahmen dieser Arbeit (2.5. 2.3.) hatten jedoch gezeigt, daß V_K -Gene existieren, die keiner der bekannten Subgruppen eindeutig zugeordnet werden können. Möglicherweise handelt es sich bei diesen V_K -Genen um die Vertreter neuer, bisher unbekannter Subgruppen. Der Einsatz dieser Genproben zur Suche in Cosmidgenbanken würde verschiedene Vorteile bieten:

- Möglicherweise liegen in den Lücken, welche die bisher charakterisierten Regionen voneinander trennen, weitere Vertreter dieser seltenen Subgruppen. Eventuell würde man durch Einsatz weniger Proben Zugang zu Bereichen des V_K -Locus' finden, die ansonsten nur schwierig durch "chromosomal walking" zu isolieren wären.

- Weiterhin wäre es denkbar, daß man mit diesen divergenten V_K -Genproben wiederum noch divergentere V-Gene finden würde, die man bisher aufgrund zu geringer Kreuzhybridisierung nicht isolieren konnte.

Die gleichmäßige Verteilung der V_K -Gene auf den bisher untersuchten Regionen gibt zwar Anlaß zur Vermutung, daß diese kontinuierliche Genabfolge sich auch über die Grenzen der charakterisierten Bereiche fortsetzt. Sollten aber mehrere Extensions-schritte keine weiteren V_K -Gene erbringen, so würden große Abschnitte im V_K -Locus vorliegen, die keine oder nur wenige V_K -Gene tragen. Die Größe dieser Bereiche könnte man mit Hilfe der PFG-Elektrophorese (s. 3.2.) bestimmen oder mittels der Technik des "chromosomal jumpings" überspringen. Diese Methode wurde speziell für derartige Problemstellungen von Collins und Weissman entworfen (117) und erlaubt es, Bereiche von mehreren hundert kb zu überbrücken. Eine Bestimmung, welche Regionen des bisher charakterisierten V_K -Locus' benachbart liegen, wäre im Prinzip auch auf diese Weise möglich.

3.2 Welche Beiträge kann die Pulsfeld-Gelelektrophorese zur Strukturanalyse großer Genombereiche, wie des V_K -Locus', leisten ?

Die Untersuchung von Multigenfamilien umfaßt die Analyse von Genombereichen von mehreren hundert kb Größe. Bis vor kurzem stand keine Methode zur Verfügung, die es erlaubte, DNA-Regionen dieses Umfangs relativ schnell und einfach zu charakterisieren. Erst die Methode der Puls-Feld-Gel-Elektrophorese, die im Prinzip von Schwartz und Cantor etabliert (36, 37) und in der Folge in verschiedenen Varianten von anderen Arbeitsgruppen optimiert wurde (38, 93, 94, 95, 118), ermöglichte derartige Untersuchungen.

Mit großem Erfolg wurde diese Methode beispielsweise bei der Charakterisierung des Gens, welches mit großer Wahrscheinlichkeit in Zusammenhang mit der Duchenne-Muskel-Dystrophie steht, eingesetzt (119, 120). Ein Bereich von 6 Mb Länge konnte mit Hilfe dieser Technik grob kartiert (119) und der Genbereich näher ein-

gegrenzt werden (120). Weiterhin gelang es kürzlich (121), bei einer Methotrexatresistenten Zelllinie, die Kopplung von fünf verschiedenen Genloci auf einer Amplifikationseinheit von 1,1 Mb mittels der PFG-Technik nachzuweisen. Von A. Bird wurde diese Methode zur Kartierung von hypomethylierten, GC-reichen Sequenzbereichen im Mausgenom eingesetzt (122). Diese untermethylierten Regionen sind durch Abstände von mehreren hundert kb getrennt und werden in Zusammenhang mit der Expression von eukaryotischen Genen gebracht (102, 122). Für Karyotyp-Untersuchungen von Hefe (37, 123) oder von parasitären Einzellern wie *Plasmodium falciparum*, dem Erreger der Malaria (124), ist die PFG-Elektrophorese die Methode der Wahl.

In der vorliegenden Arbeit wurde die PFG-Elektrophorese zur näherungsweisen Größenbestimmung und zur Grobkartierung des V_K -Locus' eingesetzt. Ein wesentliches Problem bei dieser Analyse bestand zunächst in der Auswahl einer geeigneten Methode, DNA spezifisch in hochmolekulare Fragmente zu zerlegen. Von den drei verschiedenen zur Auswahl stehenden Möglichkeiten (2.6.2.2.1.) wurde schließlich die Methode der Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen, die oktamere oder hexamere Erkennungssequenzen aufweisen, der Vorzug gegeben. Die meisten dieser Erkennungssequenzen enthalten das im Eukaryotengenom unterrepräsentierte Dinukleotid CpG (53) und können aufgrund der relativen Seltenheit dieser Spaltstellen bei DNA-Spaltungen zu sehr großen Fragmenten führen. Die Tatsache, daß Cytosin in eukaryotischer DNA überdurchschnittlich häufig methyliert vorliegt, insbesondere wenn es mit Guanin im Dinukleotid CpG auftritt (54), kann die Spaltaktivität der eben erwähnten Restriktionsnukleasen beeinträchtigen oder sogar verhindern (104, 105). Die eingesetzte Zelllinie (Prostata-Carzinom-Zelllinie; "PC3"; Ref. 96) weist einen ungewöhnlich niedrigen Methylierungsgrad auf (1 % der Cytosine bezogen auf alle Nukleotide sind methyliert; 2.6.2.2.2.). Man kann daher im allgemeinen davon ausgehen, daß die DNA-Spaltungen vollständig waren und daß die erhaltenen Hybridisierungsdaten zuverlässig sind, bzw. keine Fehlinterpretationen - zurückzuführen auf Partialspaltungen - zu befürchten sind. Dementsprechend erkannten

spezifische Hybridisierungsproben aus dem Bereich des V_K -Locus' in gespaltener, hochmolekularer PC3-DNA jeweils nur ein Fragment bei verschiedenen Einzelspaltungen (2.6.2.2.). Lediglich im Falle von BssHII traten ausnahmsweise in erheblichem Maße jeweils mehrere Hybridisierungsbanden - zurückzuführen auf Partialsplaltung - auf (2.6.2.2.). Es ist also keineswegs auf eine Unvollständigkeit der Spaltungen zurückzuführen, daß man bei NotI-Spaltungen für Hybridisierungsproben der A-, L- und O-Regionen jeweils zwei Hybridisierungsbanden von 1,0 und 1,3 Mb Größe findet. Vielmehr steht dieses Ergebnis in völliger Übereinstimmung mit der Tatsache, daß für die A- und L-Regionen jeweils eine Duplikation nachgewiesen ist (33, vorl. Arbeit) und für die O-Regionen Hinweise dafür vorliegen (34, 68).

Die Kopplungsanalyse verschiedener V_K -Regionen des V_K -Locus mit Hilfe der PFG-Elektrophorese war das eine Hauptziel der Untersuchung (2.6.3.2.). Je eine Kopie der A-, L-, O-Regionen konnte zu einer gekoppelten Gruppe zusammengefaßt werden. Einer dieser Dreiergruppen konnten zusätzlich die B- und die C_K -Regionen angegliedert werden (2.6.3.2.). Außerdem wurde versucht, durch den Einsatz von V_K -Proben den Umfang der V_K -Genfamilie zu bestimmen (2.6.3.1.). Dieser konnte aufgrund von Hybridisierungsdaten auf etwa 3-4 Mb bestimmt werden. Dieser Schätzung mußten einige Annahmen zugrunde gelegt werden:

- Die bisher charakterisierten Regionen sollten durch (noch nicht bekannte) Bereiche mit weiteren V_K -Genen verbunden sein. Die gleichmäßige Verteilung der V_K -Gensegmente auf den bisher analysierten Regionen (33, 34, 56, 57, 65, 67, 68, 127, vorl. Arbeit) spricht dafür, daß auch jenseits der bisher analysierten Bereiche neue V_K -Gene folgen sollten. Lediglich bei den W-Regionen liegt eine Ausnahme vor: Hier findet man große Randbereiche ohne V_K -Gene (34, 65). Es wäre jedoch möglich, daß die W-Regionen translozierte Regionen auf Chromosom 2 sind und nicht mehr innerhalb des V_K -Locus' vorliegen (65, R. Thiebe, unveröffentlicht).

- Die Gene, die möglicherweise neue Subgruppen repräsentieren (24, vorl. Arbeit), sollten in geringer Kopienzahl vorliegen. Insbesondere sollte für deren Organisation entsprechendes gelten

wie für die V_K -Gene der anderen Subgruppen, nämlich eine gemischte Abfolge der V_K -Gensegmente der verschiedenen Subgruppen im V_K -Locus. Dies wurde bisher für alle analysierten V_K -Regionen gefunden (33, 34, 57, 65, 67, 68, 127, vorl. Arbeit). Auch die drei Gene der möglichen neuen Subgruppen sind eingebunden in Regionen bestehend aus einer Reihe von V_K -Genen anderer Subgruppen (127, vorl. Arbeit).

- Nicht nur die V_K -Gene des V_K -Locus', sondern auch die translozierten V_K -Gene können bei den Hybridisierungen mit Proben der Subgruppe I und II (2.6.3.1.) erfaßt worden sein. Allerdings sollten diese Hybridisierungsdaten aus folgendem Grund die Abschätzung des Umfangs des V_K -Locus nur geringfügig beeinträchtigen: Die bisherige Analyse der V_K -Genfamilie gibt Anlaß zu der Vermutung, daß nur ein relativ geringer Anteil aller V_K -Gene (etwa 10 %) transloziert ist (56).

Die Auswertung der Hybridisierungsdaten, die mit V_K -Proben der Subgruppe I und II erhalten worden waren, ergab einen Umfang des V_K -Locus von etwa 3-4 Mb (2.6.3.1.). Berücksichtigt man auf der anderen Seite die Hybridisierungsdaten, die mit Hilfe von spezifischen Proben aus den verschiedenen Regionen erhalten worden waren, so erhält man einen Wert von etwa 3,5 Mb (Summe der NotI-Fragmente der Regionen auf Chromosom 2; Tab. 8). Die grobe Übereinstimmung dieser beiden unabhängigen Größenbestimmungen läßt den Schluß zu, daß wahrscheinlich bereits der Hauptanteil aller V_K -Gene auf den charakterisierten Regionen vorliegt.

Für die Entstehung von Multigenfamilien geht man vom Modell einer schrittweisen Evolution aus (125, 126). Genfamilien sollten durch wiederholte, schrittweise Amplifikation von Vorläufereinheiten, bestehend aus einem, bzw., in der Folge mehreren Genen entstanden sein. Wie bereits mehrfach erwähnt, wurden von mehreren Genregionen (A, L, O, W) des Locus' je zwei sehr homologe Kopien gefunden. Außerdem konnte eine Kopplung je einer Kopie der A-, L- und O-Regionen im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden (2.6.3.2.). Es wäre also denkbar, daß ein sehr großer Bereich des V_K -Locus, bestehend aus den Urkopien der A-, L- und O-Regionen, im

Laufe der Evolution in seiner Gesamtheit dupliziert worden ist. Demzufolge sollte die relative Anordnung der A-, L- und O-Regionen in beiden Bereichen dieselbe sein. Möglich wäre, daß beide, durch Duplikation auseinander hervorgegangenen "Gesamtregionen", in inverser Orientierung zueinander vorliegen. Diese Hypothese hatte bereits M. Pech aufgrund des Nachweises der Duplikation der L-Region (La, Lb; Ref. 33) aufgestellt. Eine derartige Organisation der V-Gensegmente des V_K -Locus' würde sehr gut mit dem Inversions- Deletionsmodell (70, 71), welches die Umlagerung der V-Gene beschreibt, in Einklang stehen. Ein Teil der V_K -Gensegmente könnte demzufolge bei (Primär-)Umlagerungen durch Deletion von DNA-Bereichen an J_K -Gensegmente, bzw. den C_K -Locus angefügt werden, wie dies das einfache Deletionsmodell nach Tonegawa fordert (128). Diese V_K -Gensegmente sollten nicht invers zu den J_K -, bzw. dem C_K -Gensegment angeordnet sein. Die V_K -Gene aus der zweiten Duplikationseinheit - mit inverser Orientierung - würden im einfachsten Falle durch Inversion von DNA-Bereichen umgelagert und aktiviert (70, 71). Natürlich sind bei Berücksichtigung von Sekundärumlagerungen kompliziertere Organisationsformen des V_K -Locus' denkbar. Die geschilderte Struktur würde jedoch alle Möglichkeiten der Umlagerung am einfachsten erklären. Eine schematische Darstellung der Organisation des V_K -Locus ist in Abb. 43 dargestellt.

Eine Sonderstellung nehmen dabei die W-Regionen (34) ein, die auch auf Chromosom 2 liegen, wie E. Lötscher zeigen konnte (69). Die W-Regionen wurden im vorliegenden Entwurf nicht in den Kernbereich des V_K -Locus' miteinbezogen. Es kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, daß die W-Regionen Teile der beiden Einheiten darstellen, die durch Duplikation auseinander hervorgegangen sind. Es gibt jedoch einige Hinweise, die darauf hindeuten, daß die W-Regionen möglicherweise in translozierter Form auf Chromosom 2 vorliegen und nicht im Bereich des V_K -Locus' lokalisiert sind:

- Bei den W-Regionen wurden nur im Kernbereich der W-Regionen (Wa, Wb) V_K -Gene nachgewiesen (34, 65). Innerhalb weiter 3'-Flankenbereiche (etwa 70 kb) waren keine V_K -Gene gefunden worden (34, 65). Dies könnte auf eine Isolierung dieser Regionen, wie im

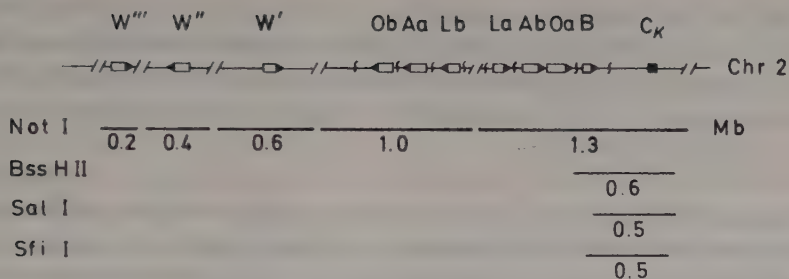


Abb. 43: Schematische Darstellung einer möglichen strukturellen Organisation des V_K-Locus' des Menschen

Die verschiedenen, bisher charakterisierten V_K-Regionen sind durch die entsprechenden Abkürzungen (7.) gekennzeichnet. Die Positionen der Regionen im V_K-Locus sind durch offene Kästchen angegeben. Der Pfeil weist auf die 5'-3'-Orientierung der Regionen, bzw. deren Gensegmente hin. Die W-Regionen sind mit W', W'' und W''' gekennzeichnet. Eine Zuordnung der Regionen Wa und Wb zu den verschiedenen NotI-Fragmenten war nämlich bisher nicht möglich. Die kleinen, geschwungenen Linien sollen symbolisieren, daß die einzelnen relativen Abfolgen vorliegen könnten. Unterbrechungen sind durch Schrägstriche dargestellt. Für die B- und C_K-Regionen wurden die Fragmente verschiedener Spaltungen angegeben, die von Proben aus beiden Regionen übereinstimmend erkannt werden.

Fälle der translozierten Region "Chr 22" (56, 64), zurückzuführen sein.

- Alle bisher sequenzierten V_K-Gene der W-Regionen sind Pseudogene (127; R. Thiede, unveröffentlicht).

- Die Hybridisierungsdaten (PFG-Elektrophorese; vorl. Arbeit 2.6.3.2.) weisen darauf hin, daß mehr als zwei Kopien der W-Regionen existieren. (Keine dieser Regionen konnte mit den A-, B-, L- und O-Regionen gekoppelt werden.)

Für eine weitergehende Analyse des V_K -Locus' mit Hilfe der PFG-Elektrophorese stehen verschiedene Möglichkeiten zur Diskussion:

- Partialsplattungen von Human-DNA, beispielsweise mit dem Enzym NotI, und Auftrennung dieser hochmolekularen DNA-Fragmente von 2-4 Mb Größe sollten Hinweise liefern, in welcher Abfolge die verschiedenen, bisher gekoppelten Gruppen von V_K -Regionen im V_K -Locus aufeinander folgen.

- Um den Abstand V_K - C_K genauer zu bestimmen, könnte man das (maximal) 500 kb große SalI-Fragment, welches sowohl mit einer Probe der B-Region als auch einer Probe der C_K -Region hybridisiert, isolieren. Nach Etablierung der DNA aus dem 500 kb Größenbereich der SalI-Spaltung in Cosmiden könnte man ein "chromosomal walking" in dieser reduzierten Genbank erheblich schneller als in einer Cosmidgenbank, die das gesamte Humangenom repräsentiert, durchführen.

- Das Problem der Ungenauigkeit von Größenbestimmung von hybridisierenden Fragmenten (2.6.2.3.) wird mit Sicherheit durch die Optimierung der PFG-Elektrophorese einerseits (93, 94) und durch genauere Größenmarker im Bereich von 1-3 Mb andererseits (kartierte Hefechromosomen) gelöst werden.

3.3. Die Evolution der V_K -Genfamilie am Beispiel der A-Regionen

Multigenfamilien, bzw. deren Mitglieder zeichnen sich durch folgende Eigenschaften aus: Multiplizität einer Sequenz, Homologie der Sequenzen, nahe Kopplung der einzelnen Loci und, gegebenenfalls, verwandte Funktion der Genprodukte. Man kann die Multigenfamilien, bzw. Multisequenzfamilien der Eukaryoten in drei Kategorien einteilen (125; Übersicht):

- Die Familie der sog. "simple sequences", Repetitionen (10^3 - 10^4) einer kleinen, nichttranskribierten Sequenzeinheit (6-15 Nukleotide) mit einem Homologiegrad von 80 - 100 %

- Die "Multiplikationsfamilie"; dabei handelt es sich um Sequenzen von 80 bis 1000 bp Länge, die in bis zu 10^4 Kopien im Genom vorliegen.

- Die Immunglobulingenfamilie zählt zur "Informationsfamilie". Aus einem frühen Vorläufer entwickelten sich individuelle Mitglieder, die deutliche Sequenzunterschiede aufweisen können, aber ähnliche Funktion haben.

Die Tatsache, daß V- und C-Proteindomänen in ihrer Tertiärstruktur deutliche Verwandtschaft zeigen, führte zu der Hypothese, daß sich die Gene, die für Antikörper codieren, aus einer einzigen, sehr frühen Vorläufereinheit durch Amplifikation entwickelt haben (129). Das hypothetische Urogen soll nach dieser Hypothese zunächst dupliziert worden sein. Der V-Anteil wurde im Gegensatz zum C-Teil in der Folge amplifiziert, was später zur Aufspaltung in verschiedene, homologe Untergruppen führte. Im Falle der V_K -Familie findet man, daß es sich im wesentlichen um vier Subgruppen handelt (21, 22). Möglicherweise existieren noch weitere, seltene Subgruppen (24, vorl. Arbeit). Für die Organisation der V-Gene dieser Subgruppen gibt es im Prinzip zwei verschiedene Möglichkeiten:

- Die Gene der verschiedenen Subgruppen liegen in physikalisch gekoppelten Familien vor, wobei die Familien ihrerseits voneinander getrennt sind. Untersuchungen an V_H -Genen des Menschen (130) und der Maus (131) bestätigten diese Möglichkeit der strukturellen Organisation.

- Die V-Gene der verschiedenen Subgruppen folgen in völlig gemischter Reihenfolge im V-Locus aufeinander. Für die V_K -Multigenfamilie konnte eine derartige Struktur nachgewiesen werden (33, 34, 57, 127, vorl. Arbeit).

Die A-Regionen weisen beispielsweise die Organisationsform von gemischten V-Genfamilien auf. Die beiden, sehr homologen A-Regionen Aa und Ab (Abb. 20; 2.4.) tragen V_K -Gene der Subgruppen I, II und III in anscheinend statistischer Abfolge. Insgesamt konnten

bisher 28 V_K -Gensegmente (Aa: 15, Ab: 13 V_K -Gene) nachgewiesen werden (vorl. Arbeit, 67). Der Abstand der einzelnen Gene zueinander beträgt zwischen 1 und 15 kb.

Für die Entwicklung dieser Struktur der A-Regionen kann man zunächst davon ausgehen, daß nur Gene einer Subgruppe den Grundstock der A-Region(en) bildete. (Die beiden A-Regionen Aa und Ab sind durch Duplikation auseinander hervorgegangen, s. 2.4.3.) Durch schrittweise Amplifikation eines bestimmten V_K -Gensegmentes könnte sich über den Mechanismus des homologen, aber ungleichen cross-over eine Familie, bestehend aus V-Genen einer Subgruppe, gebildet haben. (Für den ersten Amplifikationsschritt müßte man jedoch ein Transpositionereignis annehmen, da eine Duplikation de novo ohne tandemartig wiederholte Sequenzen durch ungleiches cross-over nicht möglich sein sollten. Bei Prokaryoten sind Duplikationen von Genen in hoher Frequenz nachgewiesen worden (132)). Im Falle der A-Region könnte eine kleine Gruppe von V_{KI} -Gensegmenten die Grundmatrix dieser Region gebildet haben. 15 von 28 Genen der A-Regionen gehören diesem Subgruppentyp an. Insbesondere die benachbarten Gene A1-A3 weisen große Ähnlichkeit auf (Restriktionskarten (Abb. 20), Hybridisierungsdaten) und könnten durch ungleiches cross-over auseinander hervorgegangen sein.

Um die vorliegende Struktur der A-Region(en) zu erklären, reicht jedoch ein einfaches Amplifikationsmodell nicht aus. Man muß zusätzlich annehmen, daß V_K -Gene anderer Subgruppen durch Transpositionereignisse in eine Frühform der A-Region eingefügt worden sind. Die verschiedenen Gruppen an V_K -Genen einer Subgruppe dürften sich durch Transpositionereignisse gegenseitig nach und nach vermischt haben. Dieses Modell wurde von M. Pech für die Erklärung der Evolution der L-Regionen angewandt (79).

Welche Hinweise liegen nun vor, die tatsächlich auf Transpositionereignisse hinweisen? Einerseits wurden bei V_{KI} -Genen der L-Regionen im 5'- und 3'-Flankenbereich unvollständige Sequenzwiederholungen gefunden (32), die auf ein frühes Transpositionereignis hinweisen. Weiterhin konnten auch isolierte Flankenbereiche von V_{KI} -Genen nachgewiesen werden (78). Es handelt sich dabei um die Mitglieder der L-Sequenzen, die teils in Nachbar-

schaft zu V_K I-Genen, teils isoliert vorkommen. Diese könnten ebenfalls in der Folge von Transpositionseingriffen entstanden sein (78).

Nachdem durch das Zusammenspiel verschiedener Amplifikationsergebnisse die Grundstruktur der A-Regionen entstanden war, kam es im Laufe der Evolution zu einer Duplikation dieser Region. Die Duplikation muß verhältnismäßig spät erfolgt sein, da die beiden Regionen Aa und Ab sehr homolog sind (Abb. 20) und sich nicht aufgrund einer Einfügung, bzw. Transposition weiterer V_K -Gene in nur eine A-Region unterscheiden. Auch für die L- und W-Regionen konnte die Duplikation dieser Regionen nachgewiesen werden (33, 34). Weiterhin gibt es Anhaltspunkte, die auch im Falle der O-Regionen auf eine Duplikation hinweisen (34, 68). Insbesondere konnten W. Lorenz (67) und W. Pargent (68) durch "chromosomal walking" eine der A-Regionen (Ab) mit einer der O-Regionen (Oa) verknüpfen. Wie in 2.6.3.2. dargestellt, ist es sehr wahrscheinlich, daß ein großer Bereich des gesamten, frühen V_K -Locus dupliziert worden ist und es wäre möglich, daß diese beiden Duplikationseinheiten invers zueinander orientiert vorliegen (33). Dadurch würde zwar nicht das V_K -Sequenzrepertoire an sich vergrößert, aber ein dupliziertes V_K -Gen könnte sowohl durch Deletion als auch Inversion umgelagert, bzw. aktiviert werden.

Gerade im Hinblick auf die Umlagerung der V_K -Gensegmente ist die 5'-3'-Polarität der V-Gene von wesentlicher Bedeutung. Durch Sequenzierung (2.5.) und Hybridisierung (2.4.4.) konnte die Orientierung der meisten V_K -Gene der A-Regionen (vorl. Arbeit, 68) bestimmt werden. Für alle Gensegmente wurde dieselbe 5'-3'-Orientierung gefunden. Auch für die L- und O-Regionen trifft dies zu (32, 33, 34). Lediglich im Falle der Region Wb (34, 65) wurden V_K -Gene mit inverser Anordnung zueinander nachgewiesen (65). Das Evolutionsmodell, das die Entstehung der V_K -Multigenfamilie beschreibt, läßt eine Transposition von V_K -Genen in eine bestehende Region in beliebiger Polarität zu. Da jedoch in den A-, L- und O-Regionen nur V_K -Gene in gleichsinniger Ausrichtung gefunden worden waren, muß man annehmen, daß V_K -Gene, die gegensinnig in eine V_K -Region inseriert wurden, aufgrund fehlenden Selektions-

druckes nach und nach divergiert sind. Diese Mutationen sollten zu Veränderungen geführt haben, die eine Kreuzhybridisierung mit den bekannten V_K -Genproben nicht mehr zulassen.

Abschließend sei angemerkt, daß die Struktur des V_K -Locus, soweit es die bisher untersuchten Regionen betrifft, erstaunlich stabil zu sein scheint. Denn bei der Untersuchung von DNAs verschiedener Individuen hinsichtlich des Nachweises der Duplikationen von Regionen (A-, L-, W-Regionen; vorl. Arbeit, Ref. 33, 34) mit diagnostischen Proben wurde bei keinem einzigen Individuum irgendeine Deletion in diesen Regionen nachgewiesen. Die drei Hybridisierungsproben (33, 34, vorl. Arbeit), die zusammen sechs Regionen erkennen, stammen aus Bereichen, die mehrere hundert kb voneinander entfernt im V_K -Locus liegen (2.6.3.2.; 3.2.).

3.4. Möglichkeiten der Entstehung und Bedeutung der zahlreichen Pseudogene in der V_K -Genfamilie

Das Immunsystem der Wirbeltiere ist in der Lage, für jede erdenkliche Fremdstruktur einen passenden Antikörper bereitzustellen (2, 3). Die für diesen Zweck notwendige Vielfalt an Antikörpern ist u.a. auf die relativ große Zahl an V-Gensegmenten, die für die variablen Proteindomänen codieren, zurückzuführen. Umso erstaunlicher ist es, daß ein großer Anteil der bisher in der Arbeitsgruppe sequenzierten V_K -Gene Pseudogene darstellt. Von 28 sequenzierten V_K -Genen sind 11, also etwa 40 %, als nichtfunktional aufgrund verschiedener Strukturveränderungen charakterisiert worden (32, 33, 34, 56, 57, 66, 69, 75, 127, vorl. Arbeit). Auch im Falle der V_H -Gene des Menschen (133) liegt ein erheblicher Anteil an Pseudogenen vor. Bei den Pseudogenen geht man davon aus, daß es sich um evolutionäre Relikte von ehemals intakten Genen handelt. Von den fünf, im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenzierten V_K -Genen (2.5.2.), sind zwei aus unterschiedlichen Gründen als Pseudogene zu klassifizieren. Die Gene der Z-Familie sind

aufgrund der Translozierung als nichtfunktionell einzustufen. Einige Überlegungen zum Pseudogencharakter dieser Gene sind im folgenden angeführt:

1. Das Gen A4 (Region Aa, Abb. 20; Sequenz: 2.5.2.2., Abb. 26) ist aufgrund eines überzähligen Nukleotids (Guanosin) im FR3 nicht funktionell. Der Einschub dieses Nukleotids verursacht eine Verschiebung im Leseraster. Die Insertion könnte durch fehlerhafte DNA-Replikation, ein minimales, ungleiches cross-over-Ereignis oder auch durch ein Genkonversionsereignis verursacht worden sein. Für Multigenfamilien nimmt man ein "Koevolutionsmodell" (125), auch "konzertierte Evolution" (134) genannt, an. Durch verschiedene Mechanismen, u.a. Genkonversion, kann eine bestimmte Mutation rasch in einem größeren Anteil des Repertoires einer Genfamilie verbreitet werden. Die Selektion bei Immunglobulingenen wirkt wahrscheinlich auf Gruppen von Genen, nicht auf einzelne Gene (125). Erst wenn beispielsweise eine Reihe von V-Genen eine (positive) Mutation erfahren haben, schlägt dieser Effekt auf das Gesamtsystem durch. Der Preis dieser Evolutionsvariante, bzw. des Informationstransfers durch Genkonversion ist jedoch, daß auch negative Mutationen weitergegeben werden. Andererseits könnten aber durch die Genkonversion Pseudogene laufend korrigiert und in den Kreis der funktionellen V_K -Gene zurückgeführt werden.

2. Ein besonders interessantes Pseudogen stellt das Gen A20 (Region Ab; 2.5.2.4.) dar. Wie die Sequenzanalyse (Abb. 31) klar zeigte, ist in den Intronbereich dieses V_K III-Gens ein Sequenzelement von 1,1 kb Länge eingefügt. Dieses trägt zwei repetitive Sequenzen: eine sog. "simple sequence", nämlich eine Wiederholung des Dinukleotids TG und weiterhin eine Kopie einer sog. "Alu-Sequenz". Das gesamte, inserierte Element zeigt die typischen Kennzeichen eines transposablen Elementes (87): Erstens, die Flanken des Elementes selbst bestehen aus (nichtperfekten), etwa 100 bp langen, direkten Sequenzwiederholungen. Zweitens, das Pentanukleotid GTTTT aus dem Intronbereich, das die Insertionsstelle markiert, ist dupliziert worden (Abb. 31). Ein Schema, welches

das Insertionsereignis demonstriert, ist in Abb. 44 dargestellt. Um die Tatsache zu erklären, daß die Familie der Alu-Sequenzen mit etwa 500.000 Kopien drei Prozent des Humangenoms ausmachen (135), wurden verschiedene Amplifikationsmodelle vorgeschlagen (136, Übersicht; 137). Eine Amplifikation durch Transpositionsereignisse wurde diskutiert (136) und in mehreren Fällen konnten Duplikationen der Sequenzen an den Insertionsstellen nachgewiesen werden (136, Übersicht). Das andere Charakteristikum, nämlich die direkten Sequenzwiederholungen an den Grenzen des transposablen Elementes selbst wurden bisher jedoch nicht gefunden.

Die Einfügung eines Elementes in den Intronbereich eines V_K -Gens erscheint zunächst als tolerierbar. Tatsächlich findet man jedoch eine Reihe von schwerwiegenden Veränderungen (Verschiebung im Leseraster, Mutation der Heptanukleotid-Sequenz; Abb. 31), die A20 zu einem Pseudogen machen. Es kann zwar nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß dieses transposable Element erst nach der Inaktivierung des V_K -Gens inseriert wurde. Da jedoch die Insertion auch an der entsprechenden Stelle im homologen Gen A6 (Region Aa) vorliegt (repetitives Element im Intronbereich durch Hybridisierung nachgewiesen; große Homologie der Feinkarten der Genbereiche von A6 und A20; s. Abb. 18), ist anzunehmen, daß die Insertion vor der Duplikation der A-Region geschehen ist. Es handelt sich also bei dieser Insertion um ein relativ frühes Ereignis in der Evolutionsgeschichte der A-Regionen, bzw. des V_K -Locus'.

3. Die V_K -Gene der Z-Familie (2.3.) sind mit großer Wahrscheinlichkeit auf verschiedene Chromosomen verstreut. Keines der Modelle, welche die Umlagerung von V-Genen behandelt (70, 71), sieht eine interchromosomale Umlagerung vor. Insbesondere liegen fast alle Gensegmente der verschiedenen Genfamilien immer auf demselben Chromosom vor (Ref. 9; Übersicht). Falls nicht eine interchromosomale Genkonversion im Spiel ist, wofür es keine Hinweise gibt, sollten die translozierten V_K -Gene aufgrund ihrer Abkopplung von Chromosom 2 als Pseudogene einzustufen sein. Abgesehen von den eben diskutierten Ursachen gibt es eine Reihe weiterer Veränderungen, die eine Inaktivierung von V_K -Genen be-

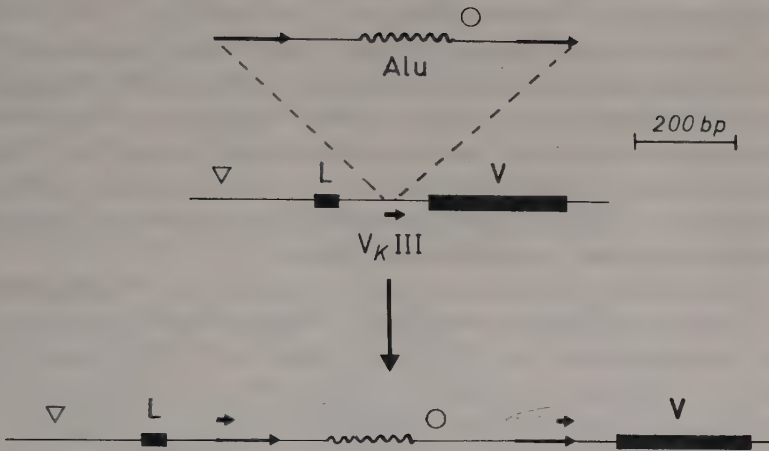


Abb. 44: Schematische Darstellung der Insertion eines transposablen Elementes in das V_K -Gen A20

Die codierenden Bereiche des V_K -III-Gens A20 sind mit ausgefüllten Balken gekennzeichnet. Das Pentanukleotid GTTTT (kurzer Pfeil) aus dem Intronbereich, markiert die Stelle, an der die Insertion erfolgte. Dieses Sequenzmotiv wurde bei der Insertion des Elementes dupliziert. Die nichtperfekten, etwa 100 bp langen, direkten Sequenzwiederholungen sind durch zwei lange Pfeile angegeben. Die geringelte Linie weist auf das Alu-Element, der offene Kreis auf eine "simple sequence" (TG_{17}) und das offene Dreieck auf eine A-reiche Region hin. Die Sequenz dieses V_K -Gens (A20) samt Insertionselement und Flankenbereichen ist unter 2.5.2.4., Abb. 31, angegeben.

wirken können: Mutationen in den pd- und dc-Signalsequenzen, Deletionen im Genbereich, Zerstörung der Hepta- und Nonanukleotid-Sequenzen. Es kann jedoch für die V_K -Gene von Chromosom 2 nicht völlig ausgeschlossen werden, daß diese, aufgrund von struk-

turellen Veränderungen, als Pseudogene deklarierten V_K -Gene, nichtsdestoweniger an der Bildung von Antikörperproteinen beteiligt sind.

- Es wäre beispielsweise möglich, daß intakte Genabschnitte dieser "Pseudogene" durch Genkonversion auf andere V_K -Segmente übertragen werden. Auf diese Weise würden diese anscheinend inaktiven V_K -Gene indirekt zur Sequenzvariabilität beitragen. Dies wäre vergleichbar mit der von Kabat (138) diskutierten "Minigen-Hypothese", wonach die FR- und CDR-Regionen der Immunglobuline auf kleine Genstücke zurückzuführen wären.

- Eine andere Möglichkeit zur Aktivierung von Pseudogenen würde in Sekundärumlagerungen bestehen. Reth (19) konnte zeigen, daß der V-Genbereich eines V_H -Gens durch die sukzessive Umlagerung zweier V_H -Segmente an ein J_H -Segment gebildet worden ist. Auf diese Weise entsteht ein somatisches Hybrid-Gensegment. Das zuerst umgelagerte Segment stellt den 3'-, das in der Folge umgelagerte V-Gen den 5'-Anteil des exprimierten V_H -Genes dar. Dadurch ist eine zusätzliche Möglichkeit zur Generierung von somatischer Variabilität gegeben. Darüberhinaus könnte ein V-Gen, das zumindest in Teilbereichen intakt ist, im Laufe mehrerer Umlagerungen zu einem funktionellen Immunglobulingen beitragen.

Unter Berücksichtigung dieser hypothetischen Aktivierungsmöglichkeiten von V-Pseudogenen muß man davon ausgehen, daß allein auf Grund von Nukleinsäuresequenzen eine eindeutige Klassifizierung von Pseudogenen bei den Immunglobulin-Multigenfamilien problematisch ist.

3.5. Modell zur Erklärung der Translozierung einer Gruppe von V_K I-Genen (Z-Familie)

Die verschiedenen Multigenfamilien des Immunsystems des Menschen sind auf mehrere Chromosomen im Genom verteilt (Ref. 9, Übersicht). Jedoch befinden sich die Mitglieder der einzelnen Multigenfamilien ihrerseits jeweils auf ein und demselben Chromosom (Ref. 9, Übersicht). Die verschiedenen Gensegmente werden durch

intrachromosomale Umlagerung zu kompletten Immungenen zusammengeschaltet (Ref. 9, Übersicht). Die Multigenfamilie des Menschen, welche für die leichten Proteinketten (K-Typ) der Antikörper kodieren, liegen beispielsweise auf Chromosom 2 (10). Von den V_K -Regionen A, B, L, O und W, die in der Arbeitsgruppe analysiert wurden (32, 33, 34, 57, 67, 68, 127, vorl. Arbeit), konnte eine Lokalisierung auf Chromosom 2 nachgewiesen werden (56, 69). Es wurden jedoch auch einige V_K -Gene gefunden (56, 57), die nicht auf Chromosom 2 liegen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Familie von verwandten V_K I-Genen, die Z-Familie (2.3.), analysiert, die mit großer Wahrscheinlichkeit im Genom transloziert ist.

Bei den V_K -Genen der Z-Familie handelt es sich um singuläre Gene der Subgruppe I. Vier unterschiedliche Regionen (Z1-Z4) von etwa 40-80 kb (charakterisierter) Größe waren analysiert worden (2.3.). Die verschiedenen Z-Regionen weisen deutliche Homologie zueinander auf (Restriktionskarten, Abb.6; Hybridisierungsdaten, 2.3.). Es existiert eine Reihe von Hinweisen, die eine Translozierung der Mitglieder der Z-Familie sehr wahrscheinlich machen (2.3.3.). In der Arbeitsgruppe sind drei weitere Regionen untersucht worden (55, 56, 64, 65, 69, vorl. Arbeit), die strukturelle Ähnlichkeit zu denjenigen der Z-Familie zeigen. Von diesen Regionen ist die Translozierung nachgewiesen (56, 69).

Verschiedentlich wurden bei Immungenen bereits Translozierungen gefunden (139, 140). Bei diesen Genen handelte es sich eindeutig um prozessierte Pseudogene, die wahrscheinlich via Transkription, anschließende Retrotranskription und Integration in das Genom vom Ort ihres Ursprungsgens entfernt wurden (139, 140). Im Falle der Z-Regionen handelt es sich jedoch um sehr große Regionen, sodaß RNA-Transkripte als Zwischenprodukte im Laufe der Translozierung auszuschließen sein sollten. Außerdem werden V-Gene in der Keimbahn wahrscheinlich ohnehin nicht transkribiert (146). Genkonversionsvorgänge sollten ebenfalls nicht die Ursache der Translozierung im Falle der Z-Familie sein, weil dabei nur relativ kleine DNA-Bereiche übertragen werden (141).

Um zu erklären, wie die großen Regionen der Z-Familie im Genom transloziert und amplifiziert worden sind, wurde ein Modell entworfen, das schematisch in Abb. 45 dargestellt ist: Das nunmehr amplifizierte V_K I-Gen der Z-Familie sollte ursprünglich im Bereich des V_K -Locus' auf Chromosom 2 gewesen sein. Durch ein Transpositionereignis könnte das Ursprungsgen der Z-Familie - beispielsweise als transposables, relativ kleines Element oder auch durch Rekombination - in einen Bereich außerhalb des V_K -Locus' gelangt sein. Damit könnte man nun zwar erklären, weshalb dieses V_K I-Gen transloziert ist, nicht jedoch, aus welchem Grund es jetzt in mehreren, homologen Kopien vorliegt. V_K -Gene, die transloziert, nicht aber amplifiziert sind, wurden gefunden (56, 67). Es wäre denkbar, daß dieses spezielle V_K I-Gen der Z-Familie zufällig in die Nähe eines Elementes geraten ist, welches häufige Transpositionen bewirkt. Es muß sich dabei um einen Vorgang handeln, der die Duplikation einer Region bewirkt. Amplifikationen (zwar unter Selektionsdruck) sind für das Dihydrofolat-Reduktasegen beispielsweise bekannt (115). Je nachdem, inwieweit durch die Duplikation die Flankenbereiche der Ausgangsregion betroffen waren, weisen Mutter- und Tochterkopie über kürzere oder längere Bereiche Homologie auf. Falls das translozierte Duplikat seinerseits das diskutierte Sequenzelement erhalten hat, kann diese translozierte Region wiederum den Ausgangspunkt für weitere Translozierungen darstellen. Dieses Modell würde der Tatsache Rechnung tragen, daß die Mitglieder der Z-Regionen über verschiedene große Bereiche Homologie zueinander aufweisen.

Auf einem späteren Stadium der Analyse der V_K -Gene der Z-Familie durch DNA-Sequenzanalysen könnte dieses Modell verifiziert werden. Aufgrund der natürlichen Mutationsrate unterliegt jedes Gen der Z-Familie einer fortschreitenden Veränderung. Jede Tochterkopie, die aus einer Duplikation hervorgegangen ist, muß die Mutationen der Mutterkopie aufweisen, falls nicht der extrem unwahrscheinliche Fall einer Rückmutation eingetreten ist. Die Tochterkopie ist ihrerseits durch neuerworbene Mutationen gekennzeichnet, die sie weitergibt. Durch DNA-Sequenzvergleiche sollte ein Stammbaum erstellbar sein, der diese "Genealogie" widerspie-

V_K -LOCUS Chr2

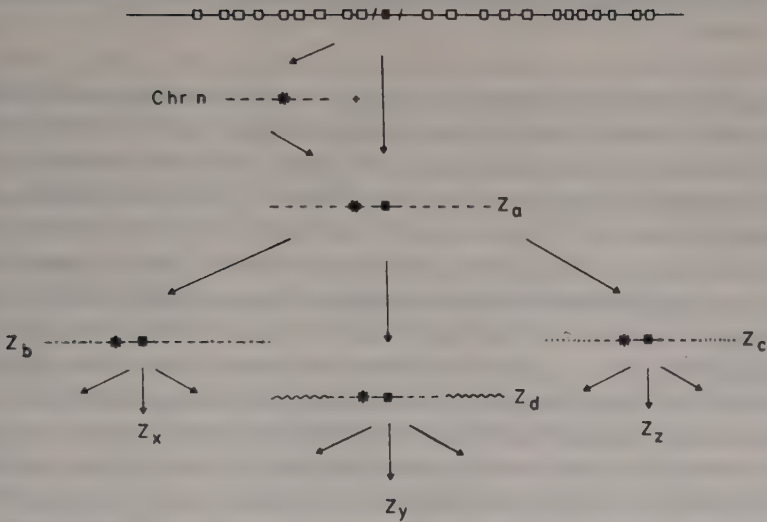


Abb. 45: Modell zur Erklärung der Translozierung einer verwandten Gruppe von V_K -Genen (Z-Familie)

Offene Kästchen symbolisieren V_K -Gensegmente von Chromosom 2, das ausgefüllte Kästchen dasjenige V_K -Gen, das transloziert wird. Das Sternsymbol weist auf das Sequenzelement hin, welches wesentlich zur Amplifikation des zunächst translozierten V_K -Gens beitragen soll. Dieses wurde willkürlich in die 5'-Region gesetzt. Die gestrichelte Linie markiert Bereiche von Chr n, andere Regionen sind unterschiedlich durch punktierte, strichpunktierte und geringelte Linien dargestellt. Die Darstellung ist nicht maßstabsgetreu.

gelt. Wenn jedoch die Amplifikation einer Ursprungsregion in mehreren Kopien gleichzeitig erfolgt ist oder wenn nur eine einzige Region als Ausgangssituation dienen kann, müßte man ein andersartiges Verzweigungsschema finden.

3.6. Unter welchen Gesichtspunkten könnte die Untersuchung der DNA-Bereiche, die zwischen den V_K -Genen liegen, interessant sein ?

Die Supergenfamilie aller Gene, die im weitesten Sinne zum Immunsystem zu rechnen sind, setzt sich zum einen aus einzelnen Familien zusammen, die hundert und mehr Gene umfassen können. Dies hatten Untersuchungen der Immunglobulingene (9; Übersicht), der Gene des MHC-Locus' (142) oder der Gene des T-Zellrezeptorsystems (143) gezeigt. Andererseits gehören auch Gene, die in nur einer Kopie pro haploidem Genom vorliegen, dieser Supergenfamilie an. Diesbezügliche Beispiele sind das Gen Thy 1 (144) oder das Gen Leu2/T8 (110, 111). Die einzelnen Familien, bzw. Gene sind auf verschiedene Chromosomen verteilt (109). Es wurde allerdings auch eine Kopplung von Genen der Supergenfamilie, die unterschiedliche Funktionen aufweisen, nachgewiesen: Sukhatme (111) konnte zeigen, daß das Gen Leu2/T8 in der Nähe des V_K -Locus' auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 (p12) lokalisiert ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die bisher charakterisierten V_K -Regionen daraufhin untersucht, ob in der unmittelbaren Nachbarschaft zu V_K -Genen das Leu2/T8-Gen zu finden wäre (2.6.4.). Innerhalb der bisher analysierten Bereiche konnte das Leu2/T8-Gen nicht nachgewiesen werden.

Obwohl das Leu2/T8-Gen nicht in der unmittelbaren Nachbarschaft von V_K -Genen liegen dürfte, könnte man dennoch annehmen, daß in den Bereichen, welche die einzelnen V_K -Gene voneinander trennen, zusätzliche Gene vorliegen. Diese könnten mit der Supergenfamilie der Immungene in Verbindung stehen oder auch völlig anderer Natur sein. Bisher wurde lediglich das TGFA-Gen ("Transforming growth factor"; Ref. 145) in der Nähe des V_K -Locus (p13) kartiert.

Ein möglicher Weg, diese Gene zu finden, wäre, mit radioaktiv markierter mRNA, bzw. cDNA aus verschiedenen Zelllinien die bisher analysierten Regionen des V_K -Locus' zu untersuchen. Auf diese Weise sollte man transkribierte Sequenzen, die zwischen den V_K -

Genen liegen, identifizieren können. Die Sequenzierung der entsprechenden Bereiche würde möglicherweise offene Leseraster zeigen.

Eine andere Möglichkeit, Zugang zu Genen zu finden, die in den V_K -Locus eingestreut sind und transkribiert werden, könnten die sog. "HTFs" ("Hpa II Tiny Fragments", 102) bieten. Nach Untersuchungen von A. Bird (102, 122) existieren im Eukaryotengenom abgegrenzte Bereiche, die zu einem geringen Grad methyliert sind als der Großteil der DNA. Dabei handelt es sich um "Inseln" von etwa 0,5 bis 1,0 kb Größe, die GC-reich sind und wenig oder keine Basenmethylierung aufweisen. Diese Bereiche sind den selten spaltenden Restriktionsukleasen mit CpG in ihren Erkennungssequenzen und die normalerweise bei Methylierung von Nukleotiden ihrer Erkennungssequenz inaktiv sind, zugänglich. Es wird diskutiert, daß diese HTF-Bereiche Promotoreigenschaften aufweisen könnten und in der 5'-Region von transkribierten Genen vorliegen sollen (102, 122). Bei Spaltung von DNA aus Zelllinien und Auftrennung der Fragmente mit Hilfe der PFG-Elektrophorese könnte man eine Häufung von Spaltstellen an bestimmten Positionen, nämlich an HTF-Bereichen, finden. Dies würde in diesem Zusammenhang auf transkribierte Sequenzen hinweisen. (Die V_K -Gensegmente werden im nichtumgelagerten Zustand nicht oder nur in geringem Maße transkribiert(146)).

4. Materialien und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Chemikalien und Enzyme

Von der Firma Difco, Michigan, USA wurden Bactoagar und Bactotrypton, Hefeextrakte von Merck, Darmstadt, bezogen. SeaKem Agarose und Seaplaque Agarose lieferte Marine Colloids, Rockland, USA, LMP Agarose die Firma BRL, Bethesda und Agarose Typ II Sigma, St. Louis, USA. Ampicillin ("Amblosin") ist ein Produkt der Bayer AG, Leverkusen. Ethidiumbromid, SDS, Tris und PEG (Polyethylenglykol) 6000 stammten von Merck, Darmstadt. Rinderserumalbumin (BSA), Polyvinylpyrrolidon und 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid (X-Gal) kamen von Sigma GmbH München, Ficoll 400 von Pharmacia, Schweden. Die Firma Biorad, Californien, lieferte den Mischbettaustauscher AG 501-X8, Acrylamid und N-Lauroylsarcosin (Na-Salz) und N, N, N', N'-Tetramethylenethylen-diamin (TEMED) die Firma SERVA, Heidelberg. Bisacrylamid wurde von Biomol, Ilversheim bezogen, γ -Methacryloxypropyltrimethyloxysilan von Wacker Chemie, München und Dimethyldichlorsilan von BDH Chemicals Ltd. Poole, England. Die radioaktiven Chemikalien (α - ^{32}P)dATP und (α - ^{32}P)dCTP stammten von New England Nuclear (NEN), Desoxy- und Didesoxyribonukleotide von der Firma Boehringer Mannheim, ebenso Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG). Für die Sequenzierung wurde der 17 bp M13-Einzelstrangprimer von P. L. Biochemicals, Milwaukee, USA, eingesetzt.

Alle verwendeten Restriktionsnukleasen waren von Boehringer, Mannheim, mit Ausnahme von Bss HII, Mlu I, Not I, Sfi I und Sac II, die von New England Biolabs, Beverley stammten. Von Boehringer, Mannheim kamen die alkalische Phosphatase (Kälberdarm, Spezialqualität), Desoxyribonuklease I (aus Rinderpankreas), DNA-Polymerase I (E.coli, Klenow), DNA-Polymerase (E. coli, Kornberg), RNase A und T4 DNA-Ligase. Bei der Einbettung von Zellen,

bzw. DNA in Agarose wurden Proteinase K von SERVA, Feinbiochemika, Heidelberg, in allen übrigen Fällen Proteinase K der Firma Merck, Darmstadt. Lysozym wurde von SERVA, Feinbiochemika Heidelberg bezogen.

Alle anderen eingesetzten anorganischen und organischen Substanzen, die nicht eigens erwähnt wurden, stammen von der Firma Merck, Darmstadt.

4.1.2. Bakterienstämme, Vektoren und DNAs

Für die Propagation rekombinanter Klone des Einzelstrangphagen M13 wurde der Bakterienstamm JM 103 (Δ lac, pro, thi, strA, supE, endA, sbcB15, hsdR4, F''traD36, proAB, lacI^q, Δ M15) eingesetzt, welcher von der Firma P.L. Biochemicals, Milwaukee, USA geliefert wurde. Für die Propagation von Plasmiden und Cosmiden diente der Stamm E. coli 490A(r_K , m_K , met⁻, thr⁻, leu⁻, recA⁻), welcher von G. Hobum etabliert und zur Verfügung gestellt worden war. Zur Präparation der Extrakte für die in vitro-Verpackung von Cosmid-DNA wurden die beiden E. coli-Stämme BHB 2688 (N 205, recA⁻ μ m⁴³⁴, cIts, b2, red⁻, Dam, Sam/ μ) und E. Coli BHB 2690 (N 205, recA⁻ [μ m⁴³⁴, cTts, b2, red⁻, Dam, Sam/ μ]) eingesetzt. In den Stamm E. coli LE 392 (supE, supF, m_K , r_K , met⁻, trpR, gal⁻), welcher von P. Leder entwickelt wurde (61), wurde die in vitro verpackte λ -DNA (cI857 Sam7) eingebracht.

Die DNA der M13-Phagen mp7, mp8, mp9, mp10 und mp11 (147) lieferte die Firma P.L. Biochemicals, Milwaukee, USA; die M13-Phagen mp18 und mp19 stellte J. Messing (148) zur Verfügung. Die pHc79-DNA stammte von der Firma Boehringer Mannheim, ebenso die -Phagen-DNA (cI857 Sam7). Die DNA des Bakteriophagen T5 wurde von G. Combriato zur Verfügung gestellt.

E. coli- und Lachsspermien-DNA wurden bei der Firma Sigma GmbH gekauft. Die DNA (Individuum St) aus Human-Placenta war von W. Lindenmaier nach Ref. 149 präpariert und zur Verfügung gestellt worden. Die DNAs der lymphoblastoiden Zelllinie GM 607, der Myelomzelllinie GM 1500 und die DNA aus menschlicher Plazenta (Indi-

viduum AF) waren von H.G. Klobeck präpariert und zur Verfügung gestellt worden. Aus dem Blut verschiedener, nichtverwandter Individuen hatte M. Pech DNAs isoliert und zur Verfügung gestellt.

4.1.3. Zellen und Zellkultur

Die Walker-Zelllinie - ursprünglich isoliert aus Burkitt's Lymphom Gewebe von I. Magrath vom National Cancer Institute - wurde von H. Rodt, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung (GSF), München, zur Verfügung gestellt. Diese wurde ebenso wie die Zelllinie vom Typ NALM 1 (112), welche K. Pachmann (GSF, München) geliefert hatte, in RPMI 1640-Medium (Boehringer Mannheim), welches mit fötalem Kälberserum (ad 15%; Boehringer Mannheim) und Glutamin (ad 4mM) versetzt war, kultiviert. Die Zellen vom Typ PC3 (96) und HeLa (113) wurden in MEM Dulbecco-Medium (Boehringer, Mannheim), welches mit fötalem Kälberserum (ad 15 %) und (ad 2 mM) Glutamin supplementiert war, gehalten (s. 4.2.9.).

4.1.4 Genbanken, Cosmide und Hybridisierungsklone

Bei den eingesetzten Genbanken handelte es sich einerseits um die Genbank IIIC. Diese war von H.-D. Pohlenz (55) aus Plazenta-DNA (St), die mit Sau3A partialgespalten und in die BamHI-Stelle des Vektors pHCT9 kloniert worden war, erstellt worden. Für die Konstruktion der Genbanken IVA und IVb (vorl. Arbeit, 2.1. und 4.2.)) war dieselbe Plazenta-DNA verwendet worden. Es handelte sich dabei um Taq I-, bzw. um Msp I-partialgespaltene DNA, welche in die Cla I-Stelle des Vektors pHCT 9 kloniert worden war.

Der Cosmidklon cos 109, welcher einen Teil der Region Aa (s. 2.3.) repräsentiert, wurde von H. Smola kartiert (74) und zur Weiterbearbeitung zur Verfügung gestellt, ebenso wie cos 110, welches zu einer Gruppe translozierter V_K -Gene gehört (s. 2.3.)

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Hybridisierungsproben eingesetzt, welche von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe konstruiert und zur Verfügung gestellt wurden. Es handelte sich dabei um die in Tab. 10 aufgeführten Klone.

Tabelle 10: Hybridisierungsproben (V_K -Gene und V_K -Genteilebereiche) für die Charakterisierung von Cosmiden mit V_K -Genen

Klonbezeichnung	Hersteller/ Zitat	Subgruppe	Klonierter Bereich
m1-3	Ref. 66	I	L-FR 3
m1L-3	*	I	L-Intron
m607V-3	Ref. 31	II	L'-FR 3
m6410-L	Ref. 31	II	L
m21-4	Ref. 66	III	L-FR 1
m41V-7	Ref. 80	III	FR 1 - FR 3
mJIV-1	Ref. 75	IV	I - FR 3

Die Hybridisierungsklone, die aus den Flankenbereichen des Leu2/T8-Gens stammen und im Rahmen der Kopplungsanalysen mit Hilfe der PFG-Elektrophorese eingesetzt wurden, waren freundlicherweise von J.R. Parnes (Stanford University; Ref. 111, 150) zur Verfügung gestellt worden. Es handelt sich dabei um folgende Klone: "Leu 2A", ein 1,2 kb EcoRI-BamHI-Fragment aus dem 5'-Flankenbereich (7 kb Abstand) vom Ort der Gens Leu2A/T8. "Leu 2B", ein 0,6 kb PstI-BamHI-Fragment aus dem Bereich der 3'-Flanke des Gens (Abstand 6,5 kb). Beide Fragmente liegen im Vektor M13 mpl1 vor.

Der Klon m13-L, auf den mit einem Sternsymbol hingewiesen wurde, ist nicht veröffentlicht. Dieser wurde von H.-G. Klobeck konstruiert und zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um den Bereich der Signalpeptidsequenz eines V_K -Gens (V1, Ref. 66), kloniert in den M13 Vektor mp 10.

4.2. Methoden

4.2.1. Herstellung der Genbanken IVa und IVb

4.2.1.1. Präparation der Vektorarme

Je 50 µg der DNA des Vektors pHC 79 wurden in getrennten Ansätzen mit Pvu I, bzw. Sal I gespalten (2h, 37 °C). Der Test auf Vollständigkeit der Restriktionsspaltung erfolgte mit Hilfe eines analytischen 0,7 %-igen Agarosegels. Um die 5'-Phosphatgruppen abzuspalten, wurden beide Ansätze mit alkalischer Phosphatase behandelt (25°C, 30 min), die Phosphatase anschließend durch Phenolisierung inaktiviert und ein Aliquot dieser Präparation einem Ligierungstest unter Verwendung von T4-DNA-Ligase unterzogen. Dabei sollten bei vollständiger Entfernung der Phosphatgruppen keine Oligomere durch Ligierung entstehen. Da der Testansatz Spuren an Dimeren aufwies, wurde die Phosphatasebehandlung wiederholt. Der erneute Ligierungstest erbrachte keinerlei Oligomere mehr. Anschließend wurde in beiden Vektorpräparationen die Klonierungsstelle mit Spaltung durch ClaI freigelegt (2h, 37°) und nach Inaktivierung des Enzyms (Phenolisierung) die nunmehr erforderliche Religierbarkeit der erhaltenen Spaltprodukte analytisch getestet. Eine Reihe der verschiedenen möglichen Kombinationsprodukte wurde dabei erhalten. Mit Hilfe von 1%-igen Agarosegelen wurden die bei der späteren Konstruktion der rekombinanten Klone störenden Vektorfragmente von den erwünschten Vektorarmen abgetrennt und die aus diesen Präparationen erhaltene DNA wiederum auf Religierbarkeit geprüft. Dieser Test fiel positiv aus. Schließlich wurde die DNA der endgültigen Vektorarme, welche die cos-Stelle enthielten, nach Phenolisierung und anschließender Fällung mit Ethanol in 10 mM Tris (pH 8,0), 1mM EDTA gelöst und in dieser Form für die Konstruktion der Cosmide eingesetzt.

4.2.1.2. Präparation klonierbarer DNA-Fragmente geeigneter Größe aus menschlicher Plazenta-DNA durch Partialsplattung mit Msp I, bzw. Taq I

Zunächst wurden die Restriktionsenzyme Msp I und Taq I durch Inkubation definierter DNA (M13 mp 10, doppelsträngig) mit einem Überschuß an Enzym (1 µg DNA, 50 Einheiten Enzym, 4 h) bei den entsprechenden Inkubationstemperaturen (37, bzw. 65°C) auf unspezifischen DNA-Abbau hin getestet. Die auf einem 1%-igen Agarosegel erhaltenen Fragmentmuster ergaben keinerlei Hinweise auf unspezifischen Endo- oder Exoabbau der DNA.

Auf einem 0,3%-igen Agarosegel wurde die ungefähre, mittlere Größe der Plazenta-DNA (St) durch Vergleich mit Längenstandards (T5: 106 kb und λ : 48,5 kb) bestimmt. Dabei wurde gefunden, daß die von W. Lindenmaier, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig, zur Verfügung gestellte DNA-Präparation die geforderte Mindestgröße von etwa 100 kb aufwies. (DNA von geringerer Größe würde bei Partialsplattungen kaum Fragmente mit zwei klonierbaren Enden liefern.)

Um durch Partialsplattung DNA-Fragmente im Größenbereich von 40 - 50 kb zu erhalten, wurden zunächst in verschiedenen Testreihen analytische Splattungen durchgeführt. Als brauchbar erwiesen sich folgende Bedingungen: 1 µg DNA wurde mit je 0,1 Einheiten Enzym gespalten, wobei zu zehn verschiedenen Zeiten (zwischen 1 und 30 min) Aliquots dem Spaltansatz entnommen und das Restriktionsenzym durch Phenolisierung inaktiviert wurde. Die Größenbestimmung dieser Partialsplattungsprodukte wurde unter Verwendung von ungespaltener λ -DNA (48,5 kb) und gespaltener λ -DNA (mit Eco RI und Hind III) als Längenstandards auf 0,3%-igen Agarosegelen vorgenommen. Unter entsprechenden Bedingungen wurden die präparativen Partialsplattungen mit Taq I und Msp I mit jeweils 200 µg DNA ausgeführt. Nach Inaktivierung der Enzyme (Phenolisierung) wurden Aliquots gelelektrophoretisch auf die Größe der Splattungsprodukte hin untersucht. DNA, welche der jeweils längsten Inkubationszeit unterworfen worden war, wurde weiterhin auf Religierbarkeit getestet.

Durch Einsatz von T4 DNA-Ligase konnten die untersuchten Partialspaltungsfragmente über ihre kohäsiven Enden zu Oligomeren ligiert werden, wie die Gelelektrophorese zeigte.

Um Ligierungsartefakte auszuschließen, wurden die vereinigten Fraktionen der partialgespaltenen DNA mit alkalischer Phosphatase behandelt. Nach Inaktivierung des Enzyms durch Phenolisierung wurde über einen Ligierungstest die Vollständigkeit der Phosphatasebehandlung überprüft. Da im Vergleich zu DNA-Fragmenten, welche nicht mit Ligase behandelt worden waren, keine Veränderungen zu größeren Molekulargewichten hin festzustellen war (0,3 %-iges Agarosegel), konnte man von einer vollständigen Hydrolyse aller endständigen 5'-Phosphatgruppen ausgehen.

Mit Hilfe einer Dichte-Gradienten-Zentrifugation wurde eine Größenfraktionierung des DNA-Fragmentgemisches vorgenommen. Es handelte sich dabei um einen linearen NaCl-Gradienten (1,25 - 5 M NaCl, 10 mM Tris (pH=8,0), 1 mM EDTA), wie in Ref. 151 beschrieben ist. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente in einem Beckmann SW 41 Rotor bei 38000 U/min (3 h) wurde auf 0,3 %-igen Agarosegelen die Größe der in den jeweiligen Fraktionen enthaltenen DNA bestimmt. Für die Herstellung rekombinanter Cosmidklone wurden die DNA-Fraktionen im Größenbereich von 40 - 50 kb vereinigt, durch Ethanolfällung konzentriert und in TE-Lösung (10 mM Tris, pH 8,0; 1 mM EDTA) aufgenommen.

4.2.1.3. Ligierung der Vektorarme mit größenfraktionierter DNA

Die DNA-Konzentration muß bei der Herstellung rekombinanter Cosmidklone 200ng/ml überschreiten, wenn DNA-Fragmente mit zwei kompatiblen Enden bei der Ligierung nicht zirkularisieren, sondern Oligomere ausbilden sollen (152). Bei der Ligierung der Vektorarme mit den Plazenta-DNA-Fragmenten wurde weiterhin darauf geachtet, daß ein molarer Überschuß an Vektormolekülen bezüglich der zu klonierenden DNA-Moleküle gegeben war (molares Verhältnis 4:1). Die Ligierung wurde in mehreren Ansätzen durchgeführt. Es

wurde jeweils 1 µg größenfraktionierter DNA in maximal 10 µl Gesamtvolumen bei 15 °C für 15 h unter Zugabe von 1 U Ligase mit den entsprechenden Mengen an Vektormolekülen ligiert.

4.2.1.4. Herstellung der beiden komplementären Phagenextrakte und in vitro Verpackung der rekombinanten Cosmidklone

Die Herstellung der komplementären Proteinextrakte, welche für die in vitro Verpackung von Cosmid-DNA benötigt wurden - nämlich der Gefriertau-Extrakt (FTL) und der Ultraschall-Extrakt - wurde nach Ref. 60 durchgeführt. Davon abweichende Modifikationen und Einzelheiten bezüglich der Präparation der Extrakte sind in Ref. 55 angegeben. Zur Überprüfung der Qualität beider Extrakte wurde DNA des Bakteriophagen λ (Wildtyp) eingesetzt. In diesem Testsystem lieferte 1 µg λ -DNA zwischen 5×10^8 und 5×10^9 pfu's.

Die in vitro Verpackung wurde ebenfalls nach Ref. 60 durchgeführt. Je 5 µl der ligierten DNA wurden bei Raumtemperatur für 1 h mit dem Gemisch aus Gefriertau- und Ultraschall-Extrakt inkubiert. Durch Zugabe von 1 ml Phagenpuffer (60) und einem Tropfen Chloroform wurde die Verpackungsreaktion beendet. Die so hergestellten "Cosmid-Phagen" waren bei 4°C mehrere Monate bei konstantem Titer lagerfähig.

4.2.1.5. Induktion der Phagenrezeptoren im Wirtsstamm und Transfektion

Sowohl für die Konstruktion der Genbank IVa als auch IVb wurde als Wirtsstamm *E. coli* 490 A eingesetzt. Ein qualitativer Test zeigte, daß der $recA^-$ -Status dieses Stammes gegeben war: Der Vergleich der UV-Sensitivität von Bakterienkolonien des Stammes 490 A mit denjenigen des *E. coli*-Stammes LE 392, welcher als $recA^+$ -Stamm charakterisiert ist, zeigte dies.

Für die Induktion von Phagenrezeptoren standen zwei Methoden zur Auswahl: Einerseits die Inkubation der *E. coli*-Zellen in Gegenwart von 0,2 % Maltose (52) oder das Aushungern der Zellen

durch Einsatz von MgSO_4 (61), wobei letzterer Methode der Vorzug gegeben wurde. Um eine Adsorption der Phagen an die von den Bakterien ausgebildeten Rezeptoren zu erreichen, wurde eine Suspension von Cosmidphagen mit jeweils dem doppelten Volumen einer Suspension von induzierten Bakterien vereinigt. Nach einstündiger Inkubation bei 30°C wurden vier Volumenteile LB_0 -Medium zugegeben, um die Aktivierung der Ampicillin-Resistenz zu erreichen. Es wurde 30 min bei 37°C inkubiert.

Die Zellsuspensionen wurden auf Ampicillin-Agarplatten (100 $\mu\text{g/ml}$) ausplattiert. Pro Agarplatte ($\varnothing$ 15 cm) wurde je nach Titer der Phagensuspension soviel an Zellsuspension eingestzt, daß maximal 10 000 Kolonien (bei 37°C) erhalten wurden.

4.2.1.6. Präparation der Koloniefilter und Anreicherung von Klonen aus Einzelkolonien

Die Übertragung der Bakterienkolonien auf Koloniefilter (Colony/Plaque-Screen, New England Nuclear, Boston), die Herstellung der Replicafilter und die Konservierung der Genbank in Form einer Dauerkultur auf Glycerinagar wurden nach der Methode von Hanahan und Meselson (153) durchgeführt. Davon abweichende Abänderungen erfolgten wie unter Ref. 55 angegeben. Die Lyse der Bakterienkolonien, die Denaturierung und Fixierung der DNA auf den Filtern geschah nach Angaben von Benton und Davis (154).

Nach Hybridisierung der Koloniefilter mit Suchklonen - wie unter 4.2.7. beschrieben - war meist aufgrund der hohen Koloniedichte das jeweilige Hybridisierungssignal einer einzelnen Kolonie nicht eindeutig zuzuordnen. Es wurden daher mehrere benachbarte Kolonien aus dem Bereich, der durch das Autoradiographie-Signal definiert war, entnommen. Diese wurden anschließend in LB -Medium suspendiert und in zwei Verdünnungen ausplattiert. Nach Übertragung der DNA auf Filter und Hybridisierung mit dem entsprechenden Suchklon war meist eine eindeutige Zuordnung der jeweiligen Signale zu einzelnen Kolonien möglich. Ansonsten mußte auf die eben beschriebene Weise ein zweiter Anreicherungsschritt erfolgen.

Die Agarplatten, von welchen die Bakterien auf die Filter übertragen worden waren, wurden bei 37°C inkubiert, bis die Kolonien wieder auf die ursprüngliche Größe nachgewachsen waren.

4.2.2. Präparation von DNA

4.2.2.1. Isolierung von Cosmid- und Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA wurde im wesentlichen nach der Methode von Birnboim und Doly (155) vorgenommen. Modifikationen dieser Prozedur wurden nach Ref. 52 ausgeführt. Die Klone wurden in LB-Medium (10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt), versetzt mit Ampicillin (100 µg/ml), über Nacht bei 37°C kultiviert. Zur Inokulation dienten stationäre Vorkulturen, bzw. für analytische Präparationen wurde LB-Medium lediglich mit einer Bakterienkolonie angeimpft. Zur Steigerung der Ausbeute wurde bei Plasmidisolierungen in der mittleren log-Phase ($OD_{580nm} = 0,8$) Chloramphenicol (200 µg/ml) zugesetzt und über Nacht inkubiert.

Der Zellaufschluß erfolgte nach der SDS/NaOH-Methode (155). Die Reinigung der DNA nach der alkalischen Lyse der Zellen geschah mit Hilfe eines CsCl-Schrägwinkelgradienten (Beckmannrotor, Ti 50.2). Nach Extraktion des Ethidiumbromids und des Cäsiumchlorids mit einem CsCl-gesättigtem n-Butanol/Isopropanolgemisch (1:1) wurde gegen TE-Puffer (pH=8,0) bei 4°C etwa 24-36 h dialysiert, wobei der Puffer mehrmals gewechselt wurde.

Die Mengenbestimmung der DNA erfolgte auf Agarosegelen durch Vergleich eines DNA-Aliquots mit einer Verdünnungsreihe von DNA bekannter Konzentration. Die Menge der Referenz-DNA war photometrisch bestimmt worden ($1 OD_{260nm} \hat{=} 50 \mu g \text{ DNA/ml}$).

4.2.2.2. Isolierung von DNA aus M13-Phagenklonen

Die RF-DNA aus rekombinaten M13-Phagenklonen wurde, wie unter 4.2.2.1. beschrieben, isoliert. Zur Anzucht der M13-Klone waren E.coli JM 103-Kulturen in der halblogarithmischen Phase ($OD_{580nm} = 0,5$) mit den jeweiligen M13-Phagen infiziert und über Nacht bei 37°C kultiviert worden.

Für die Präparation der Einzelstrang-DNA von M13-Phagenklonen wurden die Bakterienzellen abzentrifugiert und die Einzelstrang-DNA aus dem Phagenüberstand nach F. Sanger (82) isoliert. Diese DNA-Präparationen wurden nach der DNA-Konzentrationsbestimmung (über 1%-ige Agarosegele) zur DNA-Sequenzierung eingesetzt.

4.2.2.3. Präparation von DNA aus Kulturzellen

Die Proteinase K/SDS-Methode zur Isolierung von DNA aus Zellkulturzellen nach Ref. 156 wurde modifiziert. Sedimentierte Zellen (etwa 10^9) wurden in 10 ml PBS-Puffer suspendiert und durch SDS-Behandlung (0,5 % SDS, 10 mM Tris, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA) bei pH 8,0 für 12 h bei 37 °C lysiert und anschließend mit 100 µg/ml Proteinase K behandelt. Nach zweimaliger Extraktion mit Phenol und einem Reinigungsschritt durch Extraktion mit Chloroform wurde gegen eine Lösung von 50 mM Tris, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl bei pH 8,0 für etwa 48 h bei 4°C unter mehrmaligem Erneuern des Puffers dialysiert. Auf die anschließend durchgeführte Inkubation der DNA mit RNase A (50 µg/ml) bei 37°C für 1 h folgte eine Behandlung mit Proteinase K (100 µg/ml) in Kombination mit SDS (0,5%) - ebenfalls bei 37 °C für 1 h. Die DNA-Lösung wurde zweimal mit Phenol und einmal mit Chloroform extrahiert, viermal je 24 h gegen TE-Puffer dialysiert und abschließend durch Dialyse gegen Butanol konzentriert.

4.2.2.4. Präparation hochmolekularer DNA in Agarosematrix

Zellen der PC-3-Zelllinie wurden nach Trypsinierung sedimentiert, in PBS-Puffer (pH=8,0) einmal gewaschen, im entsprechenden Volumen dieses Puffers resuspendiert und 1:1 mit 1%-iger Agarose (LMP Agarose, BRL, Bethesda) - ebenfalls in PBS-Puffer - gemischt, daß eine Zellkonzentration von 2×10^7 Zellen/ml vorlag. Diese Zellsuspension in Agarose wurde zur Verfestigung in eisgekühlte Teflonschablonen gegossen, wobei die so hergestellten Agaroseblöcke einer Geltasche der Größe von 10 mm x 1,5 mm x 5 mm entsprachen. Die in die Agarose eingebetteten Zellen wurden mit 1 mg/ml Proteinase K (Serva) in 0,5 M EDTA (pH 9,5) und 1 % Natrium-nLauryl-Sarcosinat für 48 h bei 50°C behandelt und für die Spaltung der DNA mit Restriktionsnukleasen durch Waschen der Blöcke (dreimal 5 h bei 4°C) in 10 mM Tris (pH 7,5), 10 mM EDTA und 0,1 mM PMSF vorbereitet.

4.2.3. Präparation von RNA

Die Isolierung von zellulärer Gesamt-RNA wurde, wie unter Ref. 157 beschrieben, vorgenommen. Etwa 1×10^8 Zellen wurden in 3 ml eiskaltem Harnstoff-Lithiumchlorid-Puffer (157) homogenisiert, das Lysat in SW 56-Zentrifugenröhrchen (NaOH-gespült) transferiert und über Nacht auf Eis gehalten. Das Lysat wurde anschließend bei 0°C durch Zentrifugation (11 000 U/min für 20 min) sedimentiert. Nach Lösen des Sediments in 400 µl einer Lösung von 10 mM Tris (pH 7,0) wurde einmal mit Chloroform extrahiert und nach Zentrifugation der Überstand in ein NaOH-gespültes Plastik-Reagenzgefäß gefüllt. Durch Zugabe von 5 M NaCl (ad 0,6 M) und 2,5 Volumenteilen Ethanol (p.A.) wurde die RNA gefällt, anschließend zentrifugiert, das Sediment in 100 µl Natriumphosphat-Puffer (10 mM, pH 7,0) gelöst und ein Aliquot zur photometrischen Konzentrationsbestimmung (A_{260}) eingesetzt. Die RNA-Isolate wurden sofort mit Hilfe eines Ethanol/Trockeneisgemisches eingefroren und bei

-70°C aufbewahrt. Die zur Stabilisierung der RNA vorgenommene Glyoxilierung wurde, wie unter den Referenzen 158 und 159 angegeben, ausgeführt.

4.2.4. Spaltung von DNA mit Restriktionsnukleasen

4.2.4.1. DNA-Spaltungen für Restriktionskartierungen und für präparative DNA-Isolierungen; Spaltung von Gesamt-DNA

Die für die Restriktionskartierung erforderlichen analytischen Einzel- und Mehrfachspaltungen von Cosmid- und Plasmid-DNA wurden mit jeweils 0,5 - 1,0 µg DNA bei zweifachem Überschuß an Restriktionsenzym für 2 h durchgeführt. Die Temperatur wurde entsprechend den Angaben der Hersteller gewählt, als Spaltpuffer wurde ein Universalpuffer (T. Igo-Kemenes, unveröffentlicht) verwendet, der folgende Zusammensetzung hat: 0,15 mM Spermin, 0,5 mM Spermidin, 15 mM Tris (pH 7,5), 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, 0,2 mM EGTA, 7 mM MgCl₂ und 0,5 mM β -Mercaptoethanol. Abweichend davon wurden für Spaltungen mit Kpn I und Pst I die jeweils vom Hersteller angegebenen Puffer verwendet. Waren diese Enzyme bei Mehrfachspaltungen vorgesehen, so erfolgten die Spaltungen in aufeinanderfolgenden Einzelspaltungen, beginnend mit Kpn I oder Pst I. Die Restriktionsspaltungen wurden durch Zugabe von 20 Volumenprozent einer neutralen Lösung von 50 mM EDTA, 4 mM Harnstoff, 50 % (w/v) Saccharose, 0,1% (w/v) Bromphenolblau beendet.

Präparative Spaltungen und Spaltungen von genomischer DNA wurden mit entsprechend größeren Mengen analog durchgeführt.

4.2.4.2. Restriktionsspaltungen von in Agarose eingebetteter DNA

Restriktionsspaltungen von DNA, welche in eine Agarosematrix eingebettet war, wurde, was Pufferzusammensetzung und Inkubationstemperatur angingen, entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Ungefähr 10 µg an DNA (eingegossen in Agarose) wurden vor der Restriktionsspaltung für 1 h bei 4°C in 10 ml des jewei-

ligen Spaltpuffers, welcher mit PMSF (ad 0,1 mM) versetzt war, gespült. Anschließend erfolgte die Spaltung der DNA in einem Probenvolumen von 100 µl unter Verwendung von jeweils 50-100 Einheiten an Enzym für 6 h. Die Enzymaktivität wurde durch Zugabe von EDTA-Lösung (100 mM, pH 8,0) gestoppt.

4.2.5. Gelelektrophoresen und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen

4.2.5.1. Konventionelle Gelelektrophoresen bei konstantem und homogenem elektrischem Feld

Auf Agarosegelen (Ref. 92; maximal 1,8 %-ig; SeaKem Agarose, Marine Colloids Inc., Rockland, Maine USA) wurden Plasmide und Cosmide zum Zwecke der Konzentrationsbestimmung von DNA, genomische DNA zur Größenbestimmung und durch Restriktionsspaltung erzeugte Fragmentgemische aufgetrennt und untersucht. Als Elektrophoresepuffer wurde ein Tris-EDTA-Borat-Puffer (90 mM Tris, 2,5 mM EDTA, 90 mM Borsäure; Ref. 160) verwendet. Für Gele, die weniger als 0,5 % Agarose enthielten, wurde ein Tris-Acetat-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Acetat, 20 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,2; Ref. 161) eingesetzt. Analytische Auftrennungen wurden meist in Horizontalgelen, die Auftrennung genomischer, gespaltenen DNA (jeweils 10 - 20 µg) in 6 mm dicken Vertikalgelen vorgenommen. Als Längenstandard wurde DNA des Phagen λ (CI 857 Sam 7) eingesetzt, welche mit Eco RI und Hind III gespalten war. Die Gele enthielten Ethidiumbromid (1 µg/ml) und wurden unter UV-Licht fotografiert.

4.2.5.2. Durchführung der Puls-Feld-Gel-Elektrophorese ("PFGE") und der Feld-Inversions-Gel-Elektrophorese ("FIGE")

Die PFGE-Elektrophorese wurde im wesentlichen nach den Angaben von Schwartz, bzw. Carle (36, 38) durchgeführt. Die Agarosegele (20 x 20 cm; 1,0 % Agarose Typ II, Sigma, St. Louis USA) wurden für

40 h bei 15 °C in einer Elektrophoresekammer (42 x 42 cm) mit zwei rechtwinklig zueinander angelegten Feldern (10,5 V/cm) betrieben. Die beiden elektrischen Felder wechselten einander in einem definierten Zeitrhythmus, der aus dem Intervallbereich von 70 bis 140 sec gewählt war, ab. Der Elektrophoresepuffer (0,5 x TEB, pH 7,0) wurde thermostatisiert und umgepumpt.

Die Auftrennung chromosomaler Hefe-DNA mit Hilfe der Feld-Inversions-Gel-Elektrophorese ("FIGE") erfolgte nach den unter Ref. 95 beschriebenen Bedingungen. Die Zeitdauer der Spannungsimpulse, die während der Zeit des Elektrophoreselaufes linear anstieg, wurde über einen Apple IIe Computer gesteuert. Das entsprechende, selbst angefertigte Rechenprogramm (unter Mitarbeit von W. Lorenz) ist unter 4.2.12. aufgelistet.

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die Gele mit 1 µg/ml Ethidiunbromid in TEB-Puffer für 30 min gefärbt. Unspezifische Anfärbung wurde durch Waschen der Gele in TEB-Puffer (30 min) minimiert. Photographiert wurde unter UV-Licht.

Als Längenstandard dienten Multimere des Phagen λ (CI 857 Sam 7). Die Oligomerisierung der Phagen-DNA-Moleküle war durch Hybridisierung der kohäsiven Enden in 50 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7,5) nach Erhitzen der Lösung auf 55°C und langsames Abkühlen (über Nacht) auf 25°C erreicht worden. Zur Größenbestimmung hochmolekularer DNA wurden zusätzlich Präparationen von chromosomaler DNA aus Hefe eingesetzt. Diese waren freundlicherweise von E. Geigl, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München, zur Verfügung gestellt worden. Es handelte sich dabei um einen diploiden Widtyp-Hefestamm, der die Laborbezeichnung #140 trägt und ursprünglich von P. Philippsen, Universität Gießen, stammte.

4.2.5.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen wurden verschiedene Methoden eingesetzt:

Zur Isolierung von Fragmenten, die größer als 500 bp waren, wurde das entsprechende, durch Restriktionsspaltung erhaltene Fragmentgemisch auf Agarosegelen aufgetrennt. Nach der elektrophoretischen Größenauftrennung wurden die jeweiligen DNA-Fragmentbanden (Ethidiumbromidfärbung) aus dem Gel ausgeschnitten, mit der entsprechenden Menge an 5 M NaCl-Lösung versetzt, sodaß bezogen auf das Gesamtvolumen schließlich eine 0,5 molare NaCl-Lösung vorlag. Die Agarose wurde bei 65°C zum Schmelzen gebracht (162). (Die dafür verwendete Agarose, Seaplaque-Agarose, Marine Colloids Inc., Rockland, Maine USA, schmilzt bereits bei vergleichsweise niedrigen Temperaturen.) Durch Extraktion mit wassergesättigtem Phenol wurde die Agarose entfernt und die DNA anschließend durch Ethanolfällung konzentriert.

DNA-Fragmente, die kleiner als 500 bp waren, wurden über 4 mm dicke 4%-ige Polyacrylamidgele (1/20 Bisacrylamid, Tris-EDTA-Borat-Puffer) isoliert. Durch Zentrifugation durch ein engmaschiges Nylonnetz wurden die Gelstückchen zerkleinert. Die in den Geltrümmern enthaltene DNA wurde durch Elution mit einem Puffer bestehend aus 1 M NaCl, 10 mM Tris (pH 7,6), 1 mM EDTA bei 4°C über Nacht eluiert. Nach Entfernung der Gelbestandteile durch Filtration wurde die DNA mit Ethanol gefällt.

4.2.6. Klonierung isolierter DNA-Fragmente in Vektoren

4.2.6.1. Klonierung von DNA-Fragmente in M13-Phagenvektoren

Zum Zwecke der Hybridisierung, Sequenzierung und Fragmentanreicherung wurden isolierte DNA-Fragmente in M13-Phagen kloniert. Die RF-DNA der M13-Phagen mp8, mp9, mp10, mp11 (147) und mp18 und mp19 (148) wurde mit den entsprechenden Restriktionsnukleasen gespalten und die endständigen 5'-Phosphatgruppen durch Hydrolyse mit alkalischer Phosphatase entfernt. Eine Religierung der Vektoren wird dadurch verhindert (163). Die DNA-Fragmente wurden mit den präparierten Vektoren über Nacht mit T4-Ligase bei Konzentrationsbedingungen, wie sie unter Ref. 152 empfohlen werden, bei 15°C ligiert. E. coli-Zellen des Stammes JM 103 wurden nach der

Methode von Dagert und Ehrlich (164) für die Transfektion mit den DNA-Konstrukten präpariert. In Ausnahmefällen wurden die Zellen, um höhere Transformationsraten zu erreichen, nach der etwas aufwendigeren Methode nach Hanahan (165) behandelt. Die Transfektion wurde nach J. Messing (147) durchgeführt.

Mit Hilfe eines Farbtests (147) können rekombinate M13-Phagenklone (weiße plaques) von nichtrekombinanten Klonen (blaue plaques) unterschieden werden. Rekombinante Klone wurden mit sterilen Zahnstochern von der Agarplatte abgenommen, in 5 ml einer JM 103-Kultur (logarithmische Wachstumsphase, $OD_{580nm}=0,5$) überführt und 6-7 h bei 37°C geschüttelt. Die RF-DNA der rekombinanten Phagen wurde wie unter 4.2.2.2. beschrieben isoliert. Die Einzelstrang-DNA, welche bei der Sequenzierung (4.2.9.) als Template für die DNA-Polymerase I dient, wurde nach der unter Ref. 82 dargestellten Art und Weise aus dem Kulturüberstand isoliert.

Analytische Spaltungen der RF-DNA mit geeigneten Restriktionsnukleasen zeigten, ob die isolierten, rekombinanten Klone tatsächlich das zu klonierende DNA-Fragment besaßen.

4.2.6.2. Klonierung von DNA-Fragmenten in pBR 322

DNA-Fragmente von einer Größe bis zu 20 kb wurden verfahrensmäßig in ähnlicher Weise, wie es im M13-System gehandhabt wurde, in den Vektor pBR 322, der mit geeigneten Enzymen gespalten worden war, eingebaut. E. coli-Zellen des Stammes 490 A, welche nach Ref. 164 präpariert worden waren, wurden mit diesen DNA-Konstrukten transformiert. Die Selektion der positiven Klone erfolgte mit Hilfe von Ampicillin-Agarplatten (100 µg/ml). Einzelne Kolonien wurden in jeweils 10 ml LB-Medium (100 µg Ampicillin/ml) gegeben, bei 37°C über Nacht geschüttelt und die Plasmid-DNA nach Birnboim und Doly (155) isoliert.

4.2.7. DNA-Transfer auf Nitrozellulose und Hybridisierungen

Nach der Methode von Southern (166) wurden elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Moleküle auf Nitrozellulose (Schleicher und Schüll BA 85) transferiert. Das Filtermaterial "Gene Screen" (New England Nuclear, Boston) wurde eingesetzt, wenn eine mehrfache Verwendung des Filters vorgesehen war. Ausschließlich Nitrozellulose (Schleicher und Schüll BA 85) wurde verwendet für den Transfer von DNA, welche mit Hilfe der PFG-Elektrophorese aufgetrennt worden war. Nur hochmolekulare DNA (PFG-Elektrophorese) wurde vor dem Transfer einem Säureabbau (0,25 N HCl, 30 min, 25°C) unterworfen. Durch Erhitzen der Filter im Vakuumofen bei 80°C für 3 h wurde die DNA auf den Filtern fixiert.

Die Hybridisierungen mit radioaktiven Proben wurden nach Ref. 167 ausgeführt. Nach dem Vorwaschen der Filter (4xSSC, 1% SDS; 68°C, 30 min und 4 x SSC, 1% SDS, 1 x Denhardt-Lösung (168), 2 x 1 h, 68°C) und der Vorhybridisierung (4 x SSC, 1% SDS, 0,1% Pyrophosphat, 1 x Denhardt-Lösung, 100 µg/ml Lachs-Spermien-DNA; 68°C, 2-5 h) erfolgte über Nacht bei 68°C die Hybridisierung, wobei die Lösung derjenigen der Vorhybridisierung entsprach. Die Konzentration der radioaktiven Proben lag bei etwa 10-20 ng/ml. Abweichend davon wurde bei den Hybridisierungen von Koloniefiltern der Hybridisierungslösung noch denaturierte, Ultraschall-behandelte E. coli-DNA (50 µg/ml) und pHc 79-DNA (50 µg/ml) zugesetzt, um Hintergrundsignale zu unterdrücken. Für Hybridisierungen von Koloniefiltern und von Filtern mit gespaltener, genomischer Gesamt-DNA - insbesondere bei den Versuchen, welche mit Hilfe der PFG-Elektrophorese durchgeführt worden waren - wurde als Probe das Fragment des jeweiligen Hybridisierungsklones in hochligierter Form eingesetzt. Die durch Ligierung erzeugten Multimeren dieser Fragmente ergaben bei den Hybridisierungen besonders intensive Signale (s. Ref. 169).

Falls nicht ausdrücklich andere Bedingungen angegeben sind, erfolgte der letzte Waschschrift der Filter mit 0,5 x SSC bei 68°C für 30 min. (Abweichend davon wurden die Filter der Kolonie-

hybridisierungen im letzten Waschschrift mit jeweils 2 x SSC bei 68°C behandelt.) Für die Autoradiographie wurden Fuji RX-Filme zusammen mit CAWO SE6 Verstärkerfolien bei -70°C verwendet.

4.2.8. Radioaktive Markierung von DNA

Die für die Hybridisierung der Filter eingesetzte DNA wurde nach Ref. 170 durch "Nicktranslation" mit α -³²P-dATP und α -³²P-dCTP mit Hilfe von DNA-Polymerase aus E.coli (Kornberg) markiert. Nach Zugabe von Bromphenolblau/Saccharose/EDTA-Stoppuffer (171) wurden die radioaktiv markierten DNA-Fragmente von nichtumgesetzten Nukleotiden durch Ausschlußchromatographie auf 15 cm langen Sephadex G 50-fine Säulen mit einem Elutionspuffer aus 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 7,5) abgetrennt. Die spezifische Aktivität lag üblicherweise bei 1×10^8 dpm/µg DNA.

4.2.9. Sequenzierungen

Die Bereiche, welche sequenziert werden sollten (V_K -Gene und deren Flankenregionen), waren nach detaillierter Restriktionskartierung und Hybridisierung mit spezifischen V_K -Proben möglichst genau eingegrenzt worden. Isolierte DNA-Fragmente wurden in definierter Orientierung in die M13-Phagen mp 8-11 und mp 18, 19 eingebaut. Die Konstruktion der Klone erlaubte in der Regel die Sequenzierung des jeweiligen Bereiches in beide Richtungen. Die Subklone wurden wie unter 4.2.6.1. beschrieben hergestellt, die Einzelstrang-DNA nach 4.2.2.2. präpariert. Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxyketten-Abbruchmethode nach Sanger (82). Ein 17 bp M13-Einzelstrangprimer (P.L. Biochemicals) wurde eingesetzt. Um radioaktiv markierte Einzelstrangmoleküle zu erzeugen, die eine Länge von 500 bis 600 Nukleotiden überschreiten, wurden relativ niedrige Dideoxynukleotidkonzentrationen gewählt, wie sie unter Ref. 84 angegeben sind.

Für die Auftrennung der synthetischen, mit ^{32}P -markierten Einzelstrangmoleküle wurden 6%-ige Acrylamidgele (172) und ein Tris/Borat-Puffer (133 mM Tris, 88 mM Borat, 2.5 mM EDTA) verwendet. Auf 40 cm langen Gelen (1,5 kV, Raumtemperatur), welche zum Zweck einer gleichmäßigen Wärmeverteilung mit zwei 15 cm breiten Aluminiumplatten versehen waren, wurden pro Klonsequenzierung je drei unterschiedlich lang dauernde Elektrophoresen durchgeführt, welche jeweils eine Sequenzanalyse von 350 bis 400 Nukleotiden ermöglichten.

In Ausnahmefällen war es nötig, Klone bis in den Bereich von 500 bis 600 Nukleotiden zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden 100 cm lange, auf 55°C thermostatisierte Gele (3.5 kV, 15 h, 6 % Acrylamid; Ref. 83) eingesetzt. Diese Gele wurden in 15 %-iger Essigsäure fixiert, mit Wasser gespült, bei 80°C getrocknet und bei Raumtemperatur ohne Verstärkerfolie für die Autoradiographie verwendet. Ansonsten erfolgte die Autoradiographie bei den üblichen Gelen bei -78°C (keine Gelfixierung). Fuji RX-Röntgenfilme wurden benutzt.

4.2.10. Zellkultur

Die beiden lymphoiden Zelllinien (Walker, s. 4.1.3. und NALM 1, Ref. 112) wurden in einer 5%-igen CO_2 Atmosphäre bei 37°C in Suspension kultiviert. Als Medium diente RPMI 1640-Medium (173), welches mit fötalem Kälberserum (ad 15 %) und Glutamin (ad 4 mM) supplementiert war. Die Zellen wurden bei einer Dichte von 5×10^5 Zellen/ml angesetzt, jeden zweiten Tag gefüttert, u.z. durch Entfernen von ungefähr 1/3 des zellfreien Überstandes und Ersatz mit der gleichen Menge an frischem Medium. Die Zellen wurden bis zu einer Dichte von 1,5 bis 2×10^6 Zellen/ml kultiviert, bevor sie weiter vermehrt oder geerntet wurden.

Die Prostata-Carcinom-Zelllinie "PC-3" (96) und die Zelllinie HeLa (113) wurden in Kunststoffschalen (15 cm) kultiviert. Als Medium wurde MEM Dulbecco-Medium, versetzt mit fötalem Kälberserum (ad 15 %) und Glutamin (ad 2 mM), verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C und einer 5%-igen CO_2 -Atmosphäre bis zur voll-

ständigen Bedeckung des Schalenbodens wachsen gelassen, durch Wechseln des Mediums (2-3 Tage) versorgt, bevor eine Verteilung auf mehrere Schalen oder das Ernten der Zellen erfolgte.

4.2.11. Biologische Sicherheit

Entsprechend den "Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch in vitro neukombinierte Nukleinsäuren" (4. überarbeitete Fassung des Bundesgesundheitsamtes, August 1981) wurden alle Klonierungsexperimente mit menschlicher DNA unter L2/B1-Sicherheitsbedingungen durchgeführt.

4.2.12. Computerprogramme

Für die DNA-Sequenzanalysen wurden auf einem PDP-11/23-Prozessor (RT 11-System, Digital Equipment) Programme von R. Staden (174, 175) und P.S. Neumaier (32) verwendet. Mit Hilfe der von R. Staden stammenden Programme wurden die Gesamtsequenzen aus Teilsequenzen zusammengesetzt und weiterhin nach Restriktionsschnitt-Stellen untersucht. Die Programme von P.S. Neumaier wurden zur Handhabung und Auswertung der DNA-Sequenzen eingesetzt. Es wurde die EMBL-Datenbank (Heidelberg, 1984) benutzt.

Für die Steuerung der Feld-Inversions-Gel-Elektrophorese nach Carle und Olson (95) diente das speziell für diesen Zweck erarbeitete Programm "Echternach" (vorl. Arbeit, 4.2.12., S. 178-180). Herrn W. Lorenz danke ich an dieser Stelle für die Mitarbeit an diesem Programm. Es stand ein Apple IIe-Rechner für die Steuerung der Elektrophorese zur Verfügung. Das Rechenprogramm erlaubt die Eingabe variabler Parameter, berechnet die über die Laufzeit linear ansteigenden Zeitimpulse für die Vorwärts- und Rückwärtslaufrichtung der Moleküle in der Elektrophoreseapparatur und gibt diese Werte an die Elektrophoreseapparatur weiter.

Rechenprogramm "Echternach", zur Steuerung der Feld-Inversions-Gel-Elektrophorese ("FIGE"):

```

1  REM PROGRAMM "ECHTERNACH"
2  PRINT : PRINT : PRINT
3  GOTO 5000
5  HOME : PRINT : PRINT : PRINT
10 PRINT "PHANTASIA"
20 INPUT P
25 IF P = 31258 THEN GOTO 32
30 GOTO 10
32 VTAB 5
33 PRINT " "
34 PRINT : PRINT : PRINT
35 CLEAR
36 REM M GIBT AN, WIE GROSS DIE
    VARIABLE DER RECHENSCHLEIFE
    SEIN MUSS, DAMIT VON DER
    RECHENZEIT HER 1 SEC GEGE-
    BEN IST.
37 M = 470
40 GOSUB 3000
130 PRINT "GIB FUER ELEKTROPHORE
    SESTART 'ST' EIN !"
135 PRINT : PRINT
140 INPUT S$
150 IF S$ = "ST" GOTO 169
160 GOTO 130
169 HOME
170 PRINT : PRINT : PRINT
171 PRINT "SOLL NOCH EINE GEWISS
    E ZEIT GEWARTET WERDEN, BEV
    OR DAS GEL GESTARTET WIRD, S
    O GIB 'JA' EIN !"
172 INPUT VZ$
174 IF VZ$ = "JA" GOTO 8000
180 GOTO 171
200 A = AA
210 B = BA
240 TX = 0
270 POKE - 16295,0
280 HOME
290 PRINT : PRINT : PRINT
300 PRINT "ELEKTROPHORESE LAEUFT
    !"
302 PRINT : PRINT "NICHT UNTERBRE
    ECHEN !!!"
310 PRINT : PRINT : PRINT : PRINT
    : PRINT :
320 IF TX > S GOTO 800
330 POKE - 16293,0
340 GOSUB 400
350 POKE - 16294,1
355 GOSUB 500
360 GOTO 320
400 VTAB 10
420 A = AA + SA * TX
425 INVERSE
425 PRINT "VORWAERTS "
427 NORMAL : PRINT
450 DI = INT ((AE - A) / M + 0.5
    )
460 PRINT "AKTUELLE DIFFERENZ=";
    DI;" SEC"
462 V = INT (A / M + 0.5)
463 PRINT
464 PRINT "DERZEITIGE IMPULSZEIT
    :";V" SEC "
465 FOR I = 1 TO A
466 NEXT I
468 TX = TX + A
470 RETURN
500 VTAB 10
505 INVERSE
510 PRINT "RUECKWAERTS"
511 NORMAL : PRINT
512 PRINT " "
520 B = BA + SB * (TX - AA)
542 R = INT (B / M + 0.5)
543 VTAB 13
544 PRINT : PRINT "DERZEITIGE IM
    PULSZEIT:";R" SEC"
550 RV = B / A
555 VTAB 17
560 PRINT "VERHAELTNIS RUECKWAER
    TS-ZU VORWAERTS/IM-PULS (R/V
    ):";RV
600 FOR I = 1 TO B
610 NEXT I
620 TX = TX + B
622 TT = INT (TX / (M + 36)) / 1
    00
623 VTAB 22
626 PRINT "ZEIT SEIT GELSTART:";
    TT" H " "
630 RETURN
800 POKE - 16296,1
840 HOME : PRINT : PRINT : PRINT
843 FLASH
845 PRINT "ENDE DER ELEKTROPHORE
    SE"
847 NORMAL : PRINT : PRINT : PRINT
848 REM AUSGABE DER ELEKTRO-
    PHORESEBEDINGUNGEN
849 AI = AI / M
850 PRINT "ANFANGSWERT FÜR WART:";A
    I" SEC"
857 PRINT
858 AE = AE / M
860 PRINT "ENDWERT AE WART: "A
    E" SEC"
862 PRINT

```

```

864 BI = BI / M
865 PRINT "ANFANGSWERT BA WAR:" B
    I" SEC"
867 PRINT
870 BE = BE / M
890 PRINT "ENDWERT BE WAR:      " B
    E" SEC
892 PRINT : PRINT
894 S = S / (M * 60 * 60)
895 PRINT "GESAMTLAUFZEIT, S :";
    S" H"
896 PRINT : PRINT "GELSTART,DATU
    M :";F$
950 GOTO 1000
990 END
995 REM SUBROUTINEN
1000 REM LAUTSPRECHER-SUBROUTIN
    E IN DEN SPEICHER BRINGEN
1010 FOR ML = 864 TO 891
1020 READ MC
1030 POKE ML,MC
1040 NEXT ML
1191 REM CODE FUER MASCHINENPRO
    GRAMM UM
1192 REM EINEN TON ZU ERZEUGEN
1193 REM BENUTZT SPEICHERZELLEN
    864-891
1194 REM SPEICHERE TONLAENGE IN
    864
1195 REM UND TONHOEHE IN 865
1196 REM DANN AUFRUF VON 866
1200 DATA 0,115,172,97,3,174,97
    ,3,232,208,253,169
1210 DATA 4,32,168,252,173,48,1
    92,136,208,239,206
1220 DATA 96,3,208,231,96
1300 FOR C = 1 TO 3
1500 FOR O = 1 TO 2
1505 POKE 864,5
1510 POKE 865,134
1520 CALL 866
1600 POKE 864,5
1610 POKE 865,159
1630 CALL 866
1635 NEXT O
1640 FOR P = 1 TO 1000
1645 NEXT P
1700 NEXT C
1800 GOTO 6000
1850 GOTO 990
2999 REM SUBROUTINE 'REINECKE'
    (BERECHNUNG DER IMPULSZEITEN
    UND RANDBEDINGUNGEN)
3000 PRINT "DAS V-KAPPA-TEAM BEG
    RUESSST SIE AN BORD DES UNTER

```

```

PROGRAMMES 'REINECKE'. BITTE
    STELLEN SIE DAS RAUCHEN EIN
    UND LASSEN SIE DEN SICHERHE
    ITSGURT WAEHREND DER STARTPH
    ASE ANGELEGT. WIR WUENSCHEN
    IHNEN EINEN GUTEN FLUG !"
3010 PRINT : PRINT : PRINT
3012 PRINT "DATUM ? (Z.B. 23-OKT
    )"
3013 INPUT F$
3015 PRINT : PRINT
3020 HOME
3022 PRINT : PRINT
3025 PRINT "EINGABE DER LAUFDAUE
    R DER ELEKTROPHORESE IN STUN
    DEN (=S)"
3030 INPUT SS
3033 PRINT : PRINT : PRINT
3035 S = M * 60 * 60 * SS
3040 HOME : PRINT : PRINT : PRINT
3041 PRINT "ZEITSPANNE FUER ERST
    EN 'VORWAERTSIMPULS' (=AA) B
    ITTE EINGEBEN !"
3042 INPUT AA: PRINT : PRINT : PRINT
3043 AA = M * AA
3044 PRINT "ZEITSPANNE FUER LETZ
    TEN 'VORWAERTSIMPULS' IN SEK
    UNDEN BITTE EINGEBEN (=AE) !
    "
3045 INPUT AE: PRINT : PRINT : PRINT
3046 AE = M * AE
3047 PRINT "ZEITSPANNE FUER ERST
    EN 'RUECKWAERTSIMPULS' IN SE
    KUNDEN BITTE EINGEBEN (=BA)
    !"
3048 INPUT BA: PRINT : PRINT : PRINT
3049 BA = M * BA
3050 PRINT "ZEITSPANNE FUER LETZ
    TEN 'RUECKWAERTSIMPULS' IN S
    EKUNDEN BITTE ANGEBEN (=BE)
    !"
3055 INPUT BE: PRINT : PRINT : PRINT
3070 BE = M * BE
3100 SA = (AE - AA) / S
3200 SB = (BE - BA) / (S - AA)
3210 HOME
3230 PRINT : PRINT : PRINT : PRINT
3670 AI = AA
3675 BI = BA

```

```

3700 PRINT : PRINT : PRINT
3800 MA = S / (60 * 60 * M)
3850 NA = AA / M
3851 NB = AE / M
3852 NC = BA / M
3853 ND = BE / M
3855 PRINT "ZEITDAUER F. ELEKTRO
PHORESE S: ";MA" H"
3856 PRINT : PRINT
3860 PRINT "ANFANGSWERT AA: ";NA"
SEC"
3870 PRINT "ENDWERT AE: ";NB"
SEC"
3880 PRINT "ANFANGSWERT BA: ";NC"
SEC"
3890 PRINT "ENDWERT BE: ";ND"
SEC"
3892 PRINT : PRINT
3900 PRINT : PRINT
3910 PRINT "SIND DIE WERTE SO IN
ORDNUNG ?"
3911 PRINT "WENN NICHT, DANN GIB
'NEIN' EIN !"
3912 PRINT "ANSONSTEN FAHRT MAN
FORT, INDEM MAN DIE RETURN-
TASTE BETÄTIGT.": PRINT : PRINT
3920 INPUT L$
3930 IF L$ = "NEIN" GOTO 3020
4000 RETURN
5000 REM SUBROUTINE 'BEGRUESSUN
G'
5002 PRINT : PRINT : PRINT
5010 PRINT "GRUESS GOTT !": PRINT
: PRINT
5020 PRINT "ICH, DER RECHNER, HEI
SSE FERDINAND UND HABE DEN
AETZENDEN JOB, DIE NÄCHSTE
ZEIT MONOTONES ZEUG ZU RECHN
EN."
5030 PRINT : PRINT
5040 PRINT "FALLS BEI DER EINGAB
E IRGENDETWAS SCHIEF GEHEN S
OLLTE, DANN STEIGT MAN EINFAC
H AUS DEM PROGRAMM DURCH GL
EICHZEITIGES DRUECKEN DER TA
STEN 'CTRL' UND 'RESET' AUS
UND BEGINNT 'ECHTERNACH' MIT
DEM BEFEHL 'RUN ECHTERNACH'
VON NEUEM.": PRINT :
5200 PRINT "UM FORTZUFAHREN, GIB
'JA' EIN !"
5250 INPUT FL$
5300 IF FL$ = "JA" THEN GOTO 5
5400 GOTO 5200
6000 REM UNTERPROGRAMM ZUR BERE
CHNUNG DER ZEIT (MIN), DIE S
EIT ELEKTROPHORESE-ENDE VERS
TRICHEN IST.
6015 TZ = 0
6020 TY = M * 60
6030 FOR Z = 1 TO TY
6040 NEXT Z
6050 TY = INT (TY / (M * 60))
6060 VTAB 22
6065 TZ = TZ + TY
6070 PRINT "ZEIT SEIT GELABESCHAL
TUNG: ";TZ" MIN"
6075 IF TZ > 300 THEN GOTO 6200
6090 GOTO 6020
6200 VTAB 22
6210 PRINT "SEIT ELEKTROPHORESE-
ENDE SIND MEHR ALS 5 STUNDEN
VERGANGEN !"
6220 RETURN
8000 REM VERZOEGERUNGSPROGRAMM
8002 PRINT : PRINT
8004 PRINT "GIB DIE GEWUENSCHTE
VERZOEGERUNGSZEIT IN STUNDEN
H EIN !"
8010 INPUT VW
8020 VW = M * 60 * 60 * VW
8030 FOR K = 1 TO VW
8040 NEXT K
8050 GOTO 200

```

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Struktur und Organisation einer Multigenfamilie, nämlich der V-Gensegmente des Menschen vom K-Typ untersucht. Große Teile des V_K -Locus (29 V_K -Gene) wurden mit Hilfe von Cosmidklonierung charakterisiert. Außerdem wurden Bereiche des V_K -Locus, die im Laufe der Arbeit analysiert wurden, mittels der Technik des "chromosomal walkings", also der Isolierung extendierender Klone, welche eine gegebene Ausgangssituation überlappen, erweitert. Sequenzanalysen einer Reihe von V_K -Genen ermöglichten detaillierte Aussagen über die Feinstruktur von V_K -Genen. Durch Einsatz der Puls-Feld-Gel-Elektrophorese war erstmals eine Grobkartierung des V_K -Locus im Größenbereich mehrerer Mb möglich.

Zunächst waren zwei unterschiedliche Cosmidgenbanken unter Verwendung von Keimbahn-DNA (Plazenta-DNA) konstruiert worden. Diese Genbanken dienten dazu, möglichst große Bereiche der V_K -Genfamilie zu klonieren.

Den Ausgangspunkt der Arbeit bildete die Charakterisierung von vier nicht verwandten V_K -Genregionen, die insgesamt 240 kb repräsentieren. Cosmidklone, die durch Einsatz von V_K -Genproben (Subgruppe I und II) erhalten worden waren, wurden durch Restriktionskartierung und Hybridisierungen mit V_K -Subgruppen-Proben (I-IV) charakterisiert. Zwei dieser Bereiche wiesen jeweils nur ein einzelnes V_K -Gen, ein weiterer Abschnitt zwei V_K -Gensegmente auf. Der vierte Bereich mit ebenfalls zwei V_K -Genen extendierte bereits bekannte Bereiche, die sogenannten Oa- und Ob-Regionen.

Weiterhin wurde eine Gruppe sehr ähnlicher, singulärer V_{KI} -Gene ("Z-Familie", Z1-Z4) im Detail analysiert. Diese Gruppe repräsentiert zusammen rund 230 kb. Es handelt sich dabei um vier homologe Regionen, die charakterisierte Größenbereiche von 40 - 85 kb aufweisen. Insbesondere in der nahen Umgebung des V_K -Gens und in geringerem Maße in den Flankenabschnitten weisen die vier identifizierten Mitglieder dieser Gruppe deutliche Homologie auf

(Hybridisierung, Restriktionskartierung). Extensionsversuche waren für die Region Z1 erfolgreich, wobei innerhalb des extendierten Bereiches kein weiteres V_K -Gen nachweisbar war. Eine Reihe weiterer Cosmide (40 Klone) wurde für die Regionen Z2-Z4 analysiert. Diese zeigten zwar Homologie zu den jeweiligen Flankenbereichen der Z-Familie, wiesen jedoch keine völlige Übereinstimmung auf. Aufgrund von Hybridisierungen von DNAs aus Mensch-Maus-Zelllinien mit spezifischen Suchklonen wurden Hinweise auf eine Translokierung der Z-Familie im Humangenom erhalten. Ein Modell wurde entworfen, welches beschreibt, wie ausgehend von einer Ursprungssituation der Z-Familie sukzessive eine interchromosomale Amplifikation erfolgt sein kann.

Den Schwerpunkt der Dissertation bildete die eingehende Analyse der A-Regionen (Aa, Ab), zweier genreicher, sehr homologer Abschnitte des V_K -Locus auf Chromosom 2. Ausgangspunkt dieser Untersuchung waren zwei Cosmide, welche Bereiche der Regionen Aa und Ab darstellen und insgesamt 10 V_K -Gensegmente repräsentieren. Mit Hilfe spezifischer Suchklone wurden beide Bereiche in die 5'- und 3'-Richtung extendiert. Auf insgesamt 160 kb sind schließlich insgesamt 18 V_K -Gene identifiziert worden.

Die Duplikation der A-Region (Aa und Ab) wurde durch die Hybridisierung von DNAs nichtverwandter Individuen mit einem spezifischen Subklon, welcher einen Spaltstellenunterschied zwischen beiden Regionen erkennt, bewiesen. Aa und Ab sind somit keine allelischen Varianten, sondern unterschiedliche Bereiche des V_K -Locus. Dies bedeutet, daß im Laufe der Evolution große Bereiche der V_K -Multigenfamilie dupliziert wurden.

Die 18 V_K -Gensegmente, deren Abstände zueinander zwischen 1 und 15 kb variieren, weisen dieselbe 5'-3'-Polarität auf. Diese gleichsinnige Orientierung steht in Übereinstimmung mit dem Deletions-Inversions-Modell, welches die Umlagerung der V-Gene an andere Gensegmente (J, D) zur Bildung kompletter Immunglobulingene beschreibt. Die V_K -Gene der A-Regionen gehören im wesentlichen den Subgruppen I, II und III an. Zwei Gene waren jedoch keiner Gruppe eindeutig zuzuordnen, wie die Auswertung der DNA-Sequenzen zeigte. Die Gene der verschiedenen Subgruppen der A-Regionen

liegen nicht in zusammengehörigen Gruppen vor, sondern folgen in beliebiger, gemischter Reihenfolge aufeinander. Transpositionsergebnisse von V-Gensegmenten könnten also neben der Amplifikation von Ur- V_K -Genen zur aktuellen Keimbahnkonfiguration dieser Multigenfamilie geführt haben.

Die Nukleotidsequenzen von fünf V_K -Genen samt Flankenabschnitten aus den A-Regionen wurden bestimmt (insgesamt 8700 bp). Diese Analysen dienten einerseits zur Subgruppenbestimmung und Festlegung der Genorientierung, andererseits zur detaillierten Analyse von V_K -Genstrukturen. Gen A3 (V_{KII}) stellt mit hoher Wahrscheinlichkeit das Keimbahngene eines in einer lymphoiden Zelllinie (GM 607) exprimierten V_K -Gens dar. Die Gene A10 und A26 wichen hinsichtlich ihrer codierten Aminosäuresequenz deutlich von den bisher bekannten vier V_K -Subgruppentypen ab. Als Pseudogene sind eindeutig die beiden anderen analysierten V_K -Gene zu klassifizieren: Aufgrund einer Verschiebung im Leseraster kann aus dem Gen A4 kein funktionelles V_K -Protein mehr hervorgehen. Ein ungewöhnliches Pseudogen stellt das Gen A20 (V_{KIII}) dar: Die Insertion eines transposablen, repetitiven Elementes in den Intronbereich dieses Gens wurde nachgewiesen; Verschiebungen im Leseraster, eine Deletion im Genbereich, Stopcodons und mutierte Regulationssequenzen machen eine Expression dieses Gens unmöglich.

Die neuartige Technik der Pulsfeld-Gelelektrophorese wurde zur erstmaligen Grobkartierung des V_K -Locus eingesetzt. Der Umfang der V_K -Multigenfamilie wurde durch Hybridisierungsexperimente (mit verschiedenen V_K -Proben und spezifischen Suchproben aus den bisher analysierten Teilregionen) auf näherungsweise 4 Mb bestimmt. Außerdem gelang es, die Kopplung verschiedener V_K -Regionen nachzuweisen: Jeweils eine der Kopien der A-, L- und O-Regionen liegt auf einem NotI-Fragment von 1,0 Mb Größe, während die jeweils andere Kopie dieser Bereiche gemeinsam mit der (singulären) Region B auf einem 1,3 Mb NotI-Fragment lokalisiert wurde. Der gesamte V_K -Locus sollte demzufolge aus einer nahezu voll-

ständigen Duplikation einer sehr großen Vorläufereinheit entstanden sein. Die relative Anordnung dieser beiden Blöcke zueinander ist noch ungeklärt.

Schließlich konnte zum ersten Mal der Abstand von V-Gensegmenten und einem Genlocus für den konstanten Anteil der Immunglobulingene ermittelt werden: Die C_K -Region liegt zusammen mit den A-, L-, O- und B-Regionen auf einem 1.3 Mb NotI-Fragment. Durch weitere Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die V_K -Gene der B-Region maximal 500 kb vom C_K -Locus entfernt sind.

Im Zusammenhang mit den Daten anderer Mitarbeiter der Arbeitsgruppe tragen die vorliegenden Ergebnisse zum Verständnis der Organisation, Struktur und Evolution der V_K -Multigenfamilie bei.

6. Literaturverzeichnis

1. Hood, L.E., Weissman, I.L., Wood, W.B. und Wilson, J.H. (1984) Immunology, 2. Edition, Benjamin Cummings
2. Tonegawa, S. (1983) Nature 302, 575-581
3. Williamson, A.R. (1976) Ann. Rev. Biochem. 45, 467-500
4. Hilschmann, N. und Craig, L.C. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 53, 1403-1409
5. Dreyer, W.J. und Bennett, J.C. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 54, 864-869
6. Hozumi, N. und Tonegawa, S. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 3628-3632
7. Lenhard-Schuller, R., Hohn, B., Brack, C., Hirama, M. und Tonegawa, S. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4709-4713
8. Seidman, J.G. und Leder, P. (1978) Nature 276, 790-795
9. Honjo, T. und Habu, S. (1985) Ann. Rev. Biochem. 54, 803-830
10. Malcolm, S., Barton, P., Murphy, C., Ferguson-Smith, M.A., Bentley, D.L. und Rabbitts, T.H. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4957-4961
11. Brack, C., Hirama, M., Lenhard-Schuller, R. und Tonegawa, S. (1978) Cell 15, 1-14
12. Alt, F. und Baltimore, D. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4118- 4122
13. Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K. und Hood, L.E. (1980) Cell 19, 981-992
14. Shimizu, A. und Honjo, T. (1984) Cell 36, 801-803
15. Sakano, H., Hüppi, K., Heinrich, G. und Tonegawa, S. (1979) Nature 280, 288-294
16. Max, E.E., Seidman J.G. und Leder, P. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3450-3454
17. Pech, M., Höchtel, J., Schnell, H. und Zachau, H.G. (1981) Nature 291, 668-670
18. Baltimore, D. (1981) Cell 26, 295-296
19. Reth, M., Gehrman, P., Petrac, E. und Wiese, P. (1986) Nature 322, 840-842

20. Honjo, T., Packman, S., Swan, D. und Leder, P. (1976) *Biochemistry* 15, 2780-2785
21. Milstein, C. (1967) *Nature* 216, 330-332
22. Kabat, E.A., Wu, T.T., Bilofsky, H., Reid-Miller, M. und Perry, H. (1983) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda
23. Wang, A.C., Fudenberg, H.H., Wells, J.V. und Roelcke, D. (1973) *Nature New Biology* 243, 126-127
24. Stavnezer, J., Kekish, O., Batter, D., Grenier, J., Balazs, J., Henderson, E. und Zegers, B.-J.M. (1985) *Nucl. Acids Res.* 13, 3495-3514
25. Weigert, M. und Riblet, R. (1976) *Cold Spring Harbor Symp. Quart. Biol.* 41, 837-846
26. Cory, S., Tylor, B.M. und Adams, J.M. (1981) *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 103-116
27. Zeelon, E.P., Bothwell, A.L.M., Kantor, F. und Schechter, I. (1981) *Nucl. Acids Res.* 9, 3809-3820
28. Bentley, D.L. und Rabbitts, T.H. (1983) *Cell* 32, 181-189
29. Bentley, D.L. und Rabbitts, T.H. (1981) *Cell* 24, 613-623
30. Bentley, D.L. (1984) *Nature* 307, 77-80
31. Klobeck, H.-G., Solomon, A. und Zachau, H.G. (1984) *Nature* 309, 73-76
32. Pech, M., Jaenichen, H.-R., Pohlenz, H.-D., Neumaier, P.S., Klobeck, H.-G. und Zachau, H.G. (1984) *J. Mol. Biol.* 176, 189-204
33. Pech, M., Smola, H., Pohlenz, H.-D., Straubinger, B., Gerl, R. und Zachau, H.G. (1985) *J. Mol. Biol.* 183, 291-299
34. Pohlenz, H.-D., Straubinger, B., Thiebe, R., Pech, M., Zimmer, F.-J und Zachau, H.G. (1987) *J. Mol. Biol.* 193, 241-253
35. Lawn, R.M., Fritsch, E.F., Parker, R.C., Blake, G. und Maniatis, T. (1978) *Cell* 15, 1157-1174
36. Schwartz, D.C. und Cantor, C.R. (1983) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47, 189-195
37. Schwartz, D.C. und Cantor, C.R. (1984) *Cell* 37, 67-75

38. Carle, G.F. und Olson, M.V. (1984) Nucl. Acids Res. 12, 5647-5664
39. Maniatis, T., Fritsch, E.F., Lauer, J. und Lawn, R.M. (1980) Ann. Rev. Genet. 14, 145-178
40. Steinmetz, M., Winoto, A., Minard, K. und Hood, L.E. (1982) Cell 28, 489-498
41. Weiss, E.H., Golden, L., Fahrner, K., Mellor, A.L., Devlin, J.J., Bullman, H., Tiddens, H., Bud, H. und Flavell, R.A. (1984) Nature 310, 650-655
42. Gitschier, J., Wood, W.I., Goralka, T.M., Wion, K.L., Chen, E.Y., Eaton, D.H., Wehar, G.A., Capon, D.J. und Lawn, R.M. (1984) Nature 312, 326-330
43. Morrow, J.F. (1980) Methods in Enzymology 68, 3-24, Academic Press, New York
44. Kushner, S.R., (1978) Genetic Engineering, 17-23, Elsevier/ North-Holland, Amsterdam
45. Feiss, M., Fisher, R.A., Crayton, M.A. und Egner, C. (1977) Virology 77, 281-293
46. Collins, J. und Hohn, B. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4242-4246
47. Hohn, B. und Collins, J. (1980) Gene 11, 291-298
48. Collins, J. und Brüning, H.J. (1978) Gene 4, 85-107
49. Wyman, A.R., Wolfe, L.B. und Botstein, D. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2880-2884
50. Grosveld, F.G., Dahl, H.-H.M., de Boer, E. und Flavell, R.A. (1981) Gene 13, 227-237
51. Grosveld, F.G., Lund, T., Murray, E.J., Mellon, A.L., Dahl, H.-H.M. und Flavell, R.A. (1982) Nucl. Acids Res. 10, 6715-6732
52. Ish-Horowicz, D. und Burke, J.F. (1981) Nucl. Acids Res. 9, 2989- 2998
53. Swartz, M.N., Trautner, T.A. und Kornberg, A. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1961-1967
54. Gruenenbaum, Y., Stein, R., Cedar, H. und Razin, A. (1981) FEBS Lett. 124, 67-71
55. Pohlenz, H.-D. (1986) Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität München

56. Lötscher, E., Grzeschik, K.-H., Bauer, H.G., Pohlenz, H.-D., Straubinger, B. und Zachau, H.G. (1986) *Nature* 320, 456-458
57. Huber, E., (1988) Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München
58. Seed, B., Parker, R.C. und Davidson, N. (1982) *Gene* 19, 201-209
59. Erbslöh, A. (1974) Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Universität Freiburg
60. Scalenghe, F., Turco, E., Edström, J.E., Pirodda, V. und Melli, F. (1981) *Chromosoma* 82, 205-216
61. Leder, P., Tiemeier, D. und Enquist, L. (1977) *Science* 196, 175-177
62. Clarke, L. und Carbon, J. (1976) *Cell* 9, 91-99
63. Bauer, H.G., Pech, M. und Zachau, H.G. (1986) *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 367, 751-755
64. Bauer, H.G. (1986) Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München
65. Zimmer, F.-J. (1988) Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München
66. Jaenichen, H.-R., Pech, M., Lindenmaier, W., Wildgruber, N. und Zachau, H.G. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12, 5249-5263
67. Lorenz, W. (1988) Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München
68. Pargent, W. (1988) Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München
69. Lötscher, E. (1987) Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München
70. Lewis, S., Rosenberg, N., Alt, F. und Baltimore, D. (1982) *Cell* 30, 807-816
71. Lewis, S., Gifford, A. und Baltimore, D. (1984) *Nature* 308, 425-428
72. Höchtel, J., Müller, C.R. und Zachau, H.G. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 1383-1387
73. VanNess, B.G., Coleclough, C., Perry, R.P. und Weigert, M. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 262-266

74. Smola, H. (1986) Dissertation, Fakultät für Medizin der Universität München
75. Klobeck, H.-G., Bornkamm, G.W., Combriato, G., Mocikat, R., Pohlenz, H.-D. und Zachau, H.G. (1985) Nucl. Acids Res. 13, 6515-6529
76. Marsh, P., Mills, F. und Gould, H. (1985) Nucl. Acids Res. 13, 6531-6544
77. Balazs, I., Purrello, M., Kurnit, D.M., Grzeschik, K.-H. und Siniscalco, M. (1984) Somatic Cell Molec. Genet. 10, 385-397
78. Straubinger, B., Pech, M., Mühlebach, K., Jaenichen, H.-R., Bauer, H.G. und Zachau, H.G. (1984) Nucl. Acids Res. 12, 5265-5275
79. Pech, M. und Zachau, H.G. (1984) Nucl. Acids Res. 12, 9229-9236
80. Klobeck, H.-G., Meindl, A., Combriato, G., Solomon, A. und Zachau, H.G. (1985) Nucl. Acids Res. 13, 6499-6513
81. Straubinger, B., (1983) Diplomarbeit, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität München
82. Sanger, F., Coulson, A.R., Barnell, B.G., Smith, A.J.H. und Roe, B.A. (1980) J. Mol. Biol. 143, 161-178
83. Garoff, H. und Ansorge, W. (1981) Anal. Biochem. 115, 450-457
84. Jaenichen, H.-R. (1984) Dissertation, Fachbereich für Biologie der Universität München
85. Breathnach, R. und Chambon, P. (1981) Ann. Rev. Biochem. 50, 349-383
86. Falkner, F.G. und Zachau, H.G. (1984) Nature 310, 71-74
87. Shapiro, J.A. (1983) Mobile Genetic Elements, Academic Press, Inc., Orlando, Florida
88. Deininger, P.L., Jolly, D.J., Rubin, C.M., Friedmann, T. und Schmid, C.W. (1981) J. Mol. Biol. 151, 17-33
89. Hawley, R.G., Shulman, M.J. und Hozumi, N. (1984) Mol. Cell. Biol. 2565-2572
90. Lemischka, I. und Sharp, P.A. (1982) Nature 300, 330-335
91. Bartha, A., Richards, R.I., Baxter, J.D. und Shine, J. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 4867-4871

92. Aaij, C. und Borst, P. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 269, 192-200
93. Smith, C.L., Warburton, P.E., Gaal, A. und Cantor, C.R. (1986) *Genetic Engineering*, Vol. 8, Elsevier, North-Holland, Amsterdam
94. Chu, G., Vollrath, D. und Davis, R.W. (1986) *Science*, 234, 1582-1585
95. Carle, G.F., Frank, M. und Olson, M.V. (1986) *Science* 232, 65-68
96. Kaighn, M.E., Narayan, K.S., Ohnuki, Y., Lechner, J.F. und Jones, L.W. (1979) *Inv. Urol.* 17, 16-23
97. Nowell, P., Finan, J., Dalla Favera, R., Gallo, R.C., ar-Rushdi, A., Romanczuk, H., Selden, J.R., Emanuel, B.S., Rovera, G. und Croce, C.M (1983) *Nature* 306, 494-497
98. Meindl, A. (1988) Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München
99. Ledford, D.K., Goni, F., Pizzolato, M., Franklin, E.C., Solomon, A. und Frangione, B. (1983) *J. Immunology* 131, 1322-1325
100. McClelland, M., Nelson, M. und Cantor, C.R. (1985) *Nucl. Acids Res.* 13, 7171-7182
101. Bernards, A., Kooter, J.M., Michels, P.A.M., Moberts, R.M.P. und Borst, P. (1986) *Gene* 42, 313-322
102. Bird, A., Taggart, M., Frommer, M., Miller, O.J. und Macleod, D. (1985) *Cell* 40, 91-99
103. Drmanac, R., Petrović, N., Glišin, V. und Crkvenjakov, R. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14, 4691-4692
104. Brooks, J.E. und Roberts, R.J. (1982) *Nucl. Acids Res.* 10, 913-934
105. Kessler, C., Neumaier, P.S. und Wolf, W. (1985) *Gene* 33, 1-102
106. Hieter, P.A., Max, E.E., Seidman, J.G., Maizel, J.V. und Leder, P. (1980) *Cell* 22, 197-207
107. Zachau, H.G., Pech, M., Klobeck, H.-G., Pohlenz, H.-D., Straubinger, B. und Falkner, F.G. (1984) *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 365, 1363-1373
108. Sukhatme, V.P., Sizer, K.C., Vollmer, A.C., Hunkapillar, T. und Parnes, J.R. (1985) *Cell* 40, 591-597

109. Hood, L., Kronenberg, M. und Hunkapillar, T. (1985) Cell 40, 225-229 (1985)
110. Wilde, D.B., Marrak, P., Kappler, J., Dialynas, D.P. und Fitch, F.W. (1983) J. Immunol. 131, 2178-2183
111. Sukhatme, V.P., Vollmer, A.C., Erikson, J., Isobe, M., Croce, C. und Parnes, J.R. (1985) J. Exp. Med. 161, 429-434
112. Minowada, J., Tsubota, T., Greaves, M.F. und Walters, T.R. (1977) J. Nat. Canc. 59(1), 83-87
113. Gay, G.O., Coffman, W.D. und Kubicek, M.T. (1952) Cancer Res. 12, 264
114. Jørgensen, L.A., Bostock, C.J. und Bak, A.L. (1986) J. Mol. Biol. 187, 185-196
115. Federspiel, N.A., Beverley, S.M., Schilling, J.W. und Schimke, R.T. (1984) J. Biol. Chem. 259, 9127-9140
116. Bender, W., Spierer, P. und Hogness, D.S. (1983) J. Mol. Biol. 168, 17-33
117. Collins, F.S. und Weissman, S.M. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 6812-6816
118. Gardiner, K., Laas, W. und Patterson, D. (1986) Somatic Cell and Molec. Genetics 12, 185-195
119. van Ommen, G.J.B., Verkerk, J.M.H., Hofker, M.H., Monaco, A.P., Kunkel, L.M., Ray, P., Worton, R., Wieringa, B., Bakker, E. und Pearson, P.L. (1986) Cell 47, 499-504
120. Burmeister, M. und Lehrach, H. (1986) Nature 324, 582-585
121. van der Blieck, A.M., van der Velde-Koerts, T., Ling, V. und Borst, P. (1986) Mol. Cell. Biol. 6, 1671-1678
122. Brown, W.R.A. und Bird, A.P. (1986), Nature 322, 477-481
123. Carle, G.F. und Olson, M.V. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 3756-3760
124. Kemp, D.J., Corcoran, L.M., Coppel, R.L., Stahl, H.D., Bianco, A.E., Brown, G.V. und Anders, R.F. (1985) Nature 315, 347-350
125. Hood, L., Campbell, J.H. und Elgin, S.C.R. (1975) Ann. Rev. Genet. 9, 305-353
126. D'Eustachio, P. und Ruddle, F.H. (198) Science 220, 919-924

127. Huber, Ch. (1987) Diplomarbeit, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität München
128. Tonegawa, S., Hozumi, N., Matthysen, G. und Schuller, R. (1977) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41, 877-889
129. Hill, R.L., Delaney, R., Fellows, R.E. und Lebowitz, H.E. (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 56, 1762-1769
130. Rechavi, G., Bienz, B., Ram, D., Ben-Neriah, Y., Cohen, J.B., Zakut, R. und Givol, D. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 4405-4409
131. Kemp, D.J., Tyler, B., Bernard, O., Gough, N., Gerondakis, S., Adams, J.M. und Cory, S. (1981) J. Mol. Appl. Genet. 1, 245-261
132. Folk, W.R. und Berg, P. (1971) J. Mol. Biol. 58, 595-610
133. Cohen, J.B. und Givol, D. (1983) EMBO J. 2, 1795-1800
134. Zimmer, E.A., Martin, S.L., Beverley, S.M., Kan, Y. W. und Wilson, A.C. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 2158-2162
135. Rinehart, F.P., Ritch, T.G., Deininger, P.L. und Schmid, C.W. (1981) Biochemistry 20, 3003-3010
136. Singer, M.F. (1982) Int. Rev. Cytol. 76, 67-112
137. Daniels, G.R. und Deininger, P.L. (1985) Nucl. Acids Res. 13, 8939-8954
138. Kabat, E.A., Wu, T.T. und Bilofsky, H. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 2429-2433
139. Hollis, G.F., Hieter, P.A., McBride, O.W., Swan, D. und Leder, P. (1982) Nature 296, 321-325
140. Battey, J., Max, E.E., McBride, W.O., Swan, D. und Leder, P. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 5956-5960
141. Mellor, A.L., Weiss, E.H., Ramachandran, K. und Flavell, R.A. (1983) Nature 306, 792-795
142. Steinmetz, M. und Hood, L. (1983) Science 222, 727-733
143. Arden, B., Klotz, J.L., Siu, G. und Hood, L.E. (1985) Nature 316, 783-787
144. Williams, A.F. und Gagnon, J. (1982) Science 216, 696-703
145. Bootsma, D. und McAlpine, P.J. (1984) Cytog. C. Gen. 37, 22-46

146. Picard, D. und Schaffner, W. (1984) *Nature* 307, 80-82
147. Messing, J. (1983) *Methods in Enzymology* 101, 20-78
148. Norander, J., Kempe, T. und Messing, J. (1983) *Gene* 26, 101-106
149. Blin, N. und Stafford, D.W. (1976) *Nucl. Acids Res.* 3, 2303-2308
150. Maddon, P.J., Littman, D.R., Godfrey, M., Maddon, D.E., Chess, L. und Axel, R. (1985) *Cell*, 93-104
151. Lin, C.-P., Tucker, P.W., Mushinski, J.F. und Blattner, R.F. (1980) *Science* 209, 1348-1353
152. Dugaiczyk, A., Boyer, H.W. und Goodman, H.M. (1975) *J. Mol. Biol.* 96, 171-184
153. Hanahan, D. und Meselson, M. (1983) *Methods in Enzymology* 100, 333-342
154. Benton, W.D. und Davis, R.W. (1977) *Science* 196, 180-182
155. Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523
156. Gross-Bellard, M., Oudet, P. und Chambon, P. (1973) *Eur. J. Biochem.* 36, 32-38
157. Auffray, C. und Rougon, F. (1980) *Eur. J. Biochem.* 107, 303-314
158. Thomas, P.S. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 5201-5205
159. Carmichael, G.G. und McMaster, G.K. (1980) *Methods in Enzymology* 65, 380-391
160. Peacock, A.C. und Dingman, C.W. (1967) *Biochemistry* 6, 1818-1827
161. Loehning, U.E. (1969) *Biochem. J.* 113, 131-138
162. Gafner, J., De Robertis, E.M. und Philippsen, P. (1983) *EMBO J.* 2, 583-591
163. Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischer, E., Rutter, W.J. und Goodman, H.M., *Science* 196, 1313-1319
164. Dagert, M. und Ehrlich, S.D. (1979) *Gene* 6, 23-28
165. Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* 166, 557-580

166. Southern, E.M. (1975) J. Mol. Biol. 98, 503-517
167. Steinmetz, M., Zachau, H.G. und Mach, B. (1979) Nucl. Acids Res. 6, 3213-3229
168. Denhardt, D.T. (1966) Biochem. Biophys. Res. Comm. 23, 641-646
169. Meinkoth, J. und Wahl, G. (1984) Analyt. Biochemistry 138, 267-284
170. Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rodes, C. und Berg, P. (1977) J. Mol. Biol. 113, 237-251
171. Maniatis, T., E.F. Fritsch und Sambrook, J. (1982) J. Molecular Cloning CSH Lab., New York
172. Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5463-5467
173. Morton, H.J. (1970) In Vitro 6, 89-98
174. Staden, R. (1978) Nucl. Acids Res. 5, 1013-1015
175. Staden, R. (1980) Nucl. Acids Res. 8, 3673-3694
- 175'. Klobeck, H.-G., Combriato, G. und Zachau, H.G. (1984) Nucl. Acids Res. 12, 6995-7006
176. "Abbreviations and Symbols for Nucleic Acids, Polynucleotides and their Constituents" (1970) Eur. J. Biochem. 15, 203-208
177. "Abbreviations and Symbols" (1977) Eur. J. Biochem. 74, 1-6
178. Smith, H.O. und Nathans, D. (1973) J. Mol. Biol. 81, 419-423

7. Abkürzungen und Erklärungen

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar
C	konstante Region der Immunglobuline
CDR	"complementarity determining region": hypervariable Bereiche in den V-Regionen der leichten und schweren Ketten
D	"diversity-Segment": Gensegment der V-Region der schweren Ketten
dpm	radioaktive Zerfälle pro Minute
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	3,6-Dioxaoctamethylendinitrilotetraessigsäure
FR	"framework region": Regionen, die bei den variablen Anteilen von leichten und schweren Ketten die konstanten Bereiche bilden
h	Stunden
H-Kette	Schwere Kette der Immunglobuline
J	"joining"-Segment: Gensegmente, welche die V-Gen-segmente mit den konstanten C-Regionen koppeln; bei den K-Ketten codieren diese die Aminosäuren 96 - 108
kb	Kilobasepaare (1000 bp)
L	"leader"-Sequenz, Signalpeptidbereich
L-Kette	Leichte Kette der Immunglobuline
min	Minuten
Mb	Megabasenpaare (10^6 bp)
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (55 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 4,5 mM Natriumdihydrogenphosphat, 65 mM Natriumchlorid, pH 8.0)
PC3	Prostata-Carzinom-Zelllinie
PFG	Puls-Feld-Gel-Elektrophorese
pfu	Plaue-bildende Einheiten
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Ref.	Referenz
s	Sekunden

SDS	Sodiumdodecylsulfate (Na-Laurylsulfat)
SSC	Standard-Saline-Citrat (150 mM NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7.0)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	Variable Region der Immunglobuline
V_K, V_λ	Gensegmente, welche die variablen Bereiche der leichten Ketten vom K- und λ -Typ codieren

Die isolierten Cosmide sind mit einem dreistelligen Zahlencode gekennzeichnet und stammen aus folgenden Genbanken:

- cos 100 ff: Cosmidgenbank III, Sau3A-Partialsplaltung, Vektor pHC 79 bzw. pJB 8 (33, 34, 55)
- cos 500 ff: Cosmidgenbank IVb, TaqI-Partialsplaltung, Vektor pHC 79 (vorliegende Arbeit)
- cos 650 ff: Cosmidgenbank IVa, MspI-Partialsplaltung, Vektor pHC 79 (vorliegende Arbeit)

Subklone sind mit Kleinbuchstaben und Zahlen gekennzeichnet. Dabei gibt der Buchstabe an, um welchen Vektor es sich handelt ($p \hat{=}$ pBR 322, $m \hat{=}$ M13), während die Zahl auf das Ursprungscosmid verweist. Mehrere Subklone aus einem Cosmid sind fortlaufend nummeriert.

Diejenigen Regionen des V_K -Locus, welche durch überlappende Cosmide repräsentiert werden, sind mit Groß- und Kleinbuchstaben bezeichnet; der Großbuchstabe weist auf die Region hin, der Kleinbuchstabe gibt die jeweilige Kopie dieser Region an, falls diese in mehr als einer (nichtallelischen) Kopie im Genom vorliegt.

Regionen	Aa, Ab	(vorliegende Arbeit, s. 2.4.)
Region	B	(67, 127)
Regionen	La, Lb	(32, 33, 57)
Regionen	Oa, Ob	(34, 68)
Regionen	Wa, Wb	(34, 65)

Translozierte Bereiche, die einzelnen Regionen zugeordnet werden konnten (56), sind mit "Chr" und der entsprechenden Chromosomen-Nummer bezeichnet.

"Chr 1", "Chr 5", "Chr 22" (56, 64, 69)

Bereiche, die mit großer Wahrscheinlichkeit transloziert sind, jedoch noch nicht den jeweiligen Chromosomen zugeordnet werden konnten, sind mit Großbuchstaben (Z) und fortlaufenden Zahlen bezeichnet.

Z1, Z2, Z3, Z4 (vorliegende Arbeit, 2.3.)

Die V_K -Segmente sind ebenfalls mit Großbuchstaben und Zahlen benannt. Die Buchstaben geben die Region an, aus welcher das jeweilige Gen stammt, die Zahlen sind für die einzelnen Regionen, entsprechend der Zahl der V_K -Gene dieser Regionen, aufsteigend nummeriert (z.B. A1 - A14).

Hinsichtlich der Nomenklatur im allgemeinen wurde nach den Anweisungen der "IUPAC-IUB. Commission on Biochemical Nomenclature" (176, 177) verfahren. Die Bezeichnungen der Restriktionsnukleasen sind in Übereinstimmung mit den in Ref. 178 beschriebenen Empfehlungen.

In den Abbildungen wurden folgende Kurzbezeichnungen für die eingesetzten Restriktionsnukleasen verwendet:

Ac=AccI, Ap=ApaI, BII=BssHII, Bm=BamHI, Bg=BglII, BI=BglI, Cl=Clal, Dr=DraI, Ec=EcoRI, Ev=EcoRV, Ha=HpaII, HII=HindII, HIII=HindIII, Hp=HpaI, Kp=KpnI, Ms=MspI, Ml=MluI, Na=NaeI, Nr=NruI, PII=PvuII, Ps=PstI, Pv=PvuI, Rs=RsaI, SII=SacII, Sc=SacI, Sf=SfiI, Sl=SalI, Su=Sau3A, Sm=SmaI, Sp=SphI, Tq=TaqI, Xb=XbaI, Xh=XhoI

Lebenslauf

Name: Straubinger
Vorname: Bernhard
Geburtsdatum: 7. Mai 1956
Geburtsort: Schöllach, Kreis Dingolfing, Niederbayern
Name des Vaters: Straubinger, Anton
geboren am 22. Juni 1925
Beruf: Landwirt, i. R.
Name der Mutter: Straubinger, Anna
geborene Jaud; geboren am 28. März 1927
Beruf: Hausfrau
Familienstand: ledig
Konfession: römisch-katholisch
Schulbildung: Grundschule in Simbach bei Landau 1962-1967
Gymnasium in Schweiklberg (Vilshofen) 1967-73
in Passau 1973-1976
Wehrdienst: Juli 1976 bis September 1977
Hochschulstudium: Ludwig-Maximilians-Universität München
Studiengang Chemie (Diplom)
Diplomausbildung: Anorganische Chemie
Organische Chemie
Physikalische Chemie
Biochemie
Diplomhauptprüfung: 1982
Diplomarbeit: 1982/83, Institut für Physiologische Chemie,
Physikalische Biochemie und Zellbiologie der
Ludwig-Maximilians Universität München, bei
Prof. H.G. Zachau, Thema: "Charakterisierung
einer neuen DNA-Sequenzfamilie des Human-
genoms"
Dissertation: 1983-1987, Arbeitsgruppe Prof. H.G. Zachau
Thema: "Menschliche Immunglobulingene vom
K-Typ: Analyse der Multigenfamilie durch
Cosmidklonierung, Sequenzierung und Pulsfeld-
Gelelektrophorese"

